



**EVALUACIÓN DE CINCO GENES RELACIONADOS CON LA VÍA
DE SEÑALIZACIÓN DEL ÁCIDO JASMÓNICO DURANTE EL
ATAQUE DE *Aleurotrachelus socialis* Y *Mononychellus tanajoa*
EN YUCA (*Manihot esculenta* Crantz).**

WILMER ALEXIS VARGAS AGUDELO

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
VILLAVICENCIO, COLOMBIA
Año 2018**

**EVALUACIÓN DE CINCO GENES RELACIONADOS CON LA VÍA
DE SEÑALIZACIÓN DEL ÁCIDO JASMÓNICO DURANTE EL
ATAQUE DE *Aleurotrachelus socialis* Y *Mononychellus tanajoa*
EN YUCA (*Manihot esculenta* Crantz).**

WILMER ALEXIS VARGAS AGUDELO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo.

Director:

Ph.D. Biólogo, Jaime Alberto Marín Colorado.

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
VILLAVICENCIO, COLOMBIA
Año 2018**

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, por el apoyo, la paciencia, confianza y amor que me ha dado en toda mi vida, sin ella esto no hubiese sido posible.

A mi hermano, por ser mi apoyo en momentos difíciles y un ejemplo a seguir.

A Andrea, por estar a mi lado estos dos últimos años, por alegrar mis días con su linda forma de ser y llenarme de positivismo en momentos difíciles de este trabajo.

A mi director el Dr. Jaime Marín Colorado, por su tiempo y acompañamiento en todo este proceso, por todo el conocimiento que muy amablemente me brindó y por inspirarme a seguir investigando sin importar los obstáculos que se presenten.

A la Dra. Deicy Villalba por su colaboración en los análisis estadísticos.

A Alejandro Valencia, Javier Rey, Karen Sandoval, Juan Camilo Sánchez y Laura Paola López, por su compañía y ayuda en este trabajo de investigación.

Al laboratorio de Biotecnología Vegetal y Cultivo de tejidos, y, al grupo de investigación Biotox por su colaboración.

A la Universidad de Llanos y a la Dirección General de Investigaciones por financiar este proyecto.

A todas las personas que de alguna u otra forma aportaron al presente trabajo.

RESUMEN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es una fuente esencial de carbohidratos para alrededor de 500 millones de personas en países tropicales subdesarrollados. Varias plagas afectan directamente este cultivo, la mosca blanca y el ácaro verde son las principales. Los ácaros llegan a reducir el rendimiento de raíces frescas en cultivares susceptibles en un 21, 25 y 53% durante un ataque de 3, 4 y 6 meses, respectivamente, y en un 15% en los cultivares resistentes. La mosca blanca se alimenta del floema, produce clorosis y caída de hojas, afectando el rendimiento de la producción de la raíz. Los mecanismos de defensa, en este caso la vía de señalización del ácido jasmónico (AJ) y los genes involucrados en la respuesta han sido pobremente estudiados en yuca. Estudiar estos genes mediante análisis de expresión es de gran importancia para entender dichos mecanismos. Los objetivos del presente trabajo es evaluar la expresión de genes relacionados con la vía de señalización del ácido jasmónico frente al ataque de dos artrópodos plaga en yuca y establecer la preferencia de *Aleurotrachelus socialis* y *Mononychellus tanajoa* ante la yuca, evaluando el efecto de la oviposición sobre esta. Se realizaron ensayos a libre y a no libre escogencia con la finalidad de determinar la preferencia de oviposición de los artrópodos plaga. Se obtuvo que en el ensayo a no libre escogencia el genotipo CMC 40 es más susceptible a la oviposición del ácaro verde y que Ecu 72 presentaba menor oviposición a través del tiempo, entre 2 y 3 huevos menos en promedio. Entre tanto, el ensayo a libre escogencia concluyó que la oviposición era diferente en los dos genotipos, presentando Ecu 72 menor oviposición a través del tiempo. Se realizó un análisis molecular con dos enfoques, uno *in silico* y otro con los niveles de expresión. En el análisis *in silico* se caracterizó los promotores de los genes *AOS*, *CEV1*, *MYC2*, *LOX2* y *OPR2*, encontrándose con motivos *cis* relacionados con la defensa de la planta frente a estreses bióticos y abióticos. Igualmente, se usó la herramienta Genevestigator para encontrar genes relacionados con la vía del ácido jasmónico y posibles genes de referencia. El análisis de la expresión de los genes mostró que hay una regulación positiva para cuatro de los cinco genes evaluados tanto en el ataque del ácaro verde como de la mosca blanca. No existen diferencias significativas entre las regiones reguladores de los genes de *Arabidopsis* y los ortólogos en yuca. Además, se identificaron elementos *cis* que están fuertemente relacionados con la respuesta de la yuca ante estreses bióticos y abióticos, a excepción del ortólogo *MYC2*, el cual presenta el número más reducido de motivos *cis* y ninguno involucrado en la respuesta a AJ, AS, AG, ET y auxinas. El gen *G3PDH* no se expresa establemente y por lo tanto es aconsejable no usarlo como control interno. Se logró comprender parcialmente los mecanismos subyacentes de las respuestas de la yuca a dos plagas lo cual permitirá desarrollar estrategias de protección de cultivos en un contexto de múltiples atacantes. Además, los resultados obtenidos de la expresión diferencial de genes relacionados con la vía del ácido jasmónico podrían proporcionar recursos muy valiosos en programas de mejoramiento molecular de yucas resistentes a enfermedades y artrópodos plaga.

Palabras clave: ácaro verde, ácido jasmónico, estrés biótico, mosca blanca, respuesta de defensa.

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an essential source of carbohydrates for around 500 million people in third world tropical countries. Several pests affect this crop directly, the whitefly and the green mite are the most relevant ones. Mites can reduce the yield of fresh roots in susceptible cultivars by 21, 25 and 53% during an attack of 3, 4 and 6 months, respectively, and by 15% in resistant cultivars. The whitefly feeds on the phloem, produces chlorosis and leaf fall, affecting the yield of root production. The defense mechanisms, in this case, the signaling pathway of jasmonic acid (AJ) and the genes involved in the response have been poorly studied in cassava. Studying these genes through expression analysis is of great importance to understand these mechanisms. The aim of the present work is to evaluate the expression of genes related to the signaling pathway of jasmonic acid against the attack of two plague arthropods, and establish the preference of *Aleurotrachelus socialis* and *Mononychellus tanajoa* in cassava, by evaluating the effect of oviposition on this. Free and non-free choice trials were carried out in order to determine the oviposition preference of the pest arthropods. It was found that in the non-free-choice trial, the CMC 40 genotype was more susceptible to the oviposition of the green mite and the Ecu 72 had less oviposition over time, between 2 and 3 eggs less on average. Meanwhile, the free-choice trial concluded that oviposition was different in the two genotypes, with Ecu 72 exhibiting less oviposition over time. A molecular analysis was carried out with two approaches, one *in silico* and the other with the expression levels according to PCR. On the *in silico* analysis, the promoters of the genes *AOS*, *CEV1*, *MYC2*, *LOX2* and *OPR2* were characterized, mainly showing cis motifs related to the defense of the plant against biotic and abiotic stresses. On the other hand, the Genevestigator tool was used to find genes related to the jasmonic acid pathway and possible reference genes. The analysis of the expression of the genes showed that there is a positive regulation for four of the five genes evaluated both in the attack of the green mite and the whitefly. There are no significant differences between the regulatory regions of the *Arabidopsis* genes and the orthologs in cassava. In addition, cis elements were identified as strongly related to the response of cassava to biotic and abiotic stresses, with the exception of the orthologian *MYC2*, which has the smallest number of cis motifs and none involved in the response to AJ, AS, AG, ET and auxins. The *G3PDH* gene is not expressed stably and therefore it is advisable not to use it as an internal control. The underlying mechanisms of cassava responses to two pests were partially understood, which will allow the development of crop protection strategies in a context of multiple attackers. In addition, the results obtained from the differential expression of genes related to the jasmonic acid pathway could provide very valuable resources in programs for the molecular improvement of resistant cassava to diseases and pest arthropods.

Key words: green mite, jasmonic acid, whitefly, biotic stress, defense response.

Tabla de contenido

1.	INTRODUCCIÓN	11
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
3.	HIPÓTESIS.....	14
4.	OBJETIVOS	15
4.1	Objetivo general.....	15
4.2	Objetivos específicos.....	15
5.	JUSTIFICACIÓN.....	16
6.	MARCO TEÓRICO.....	19
6.1	El cultivo de yuca.....	19
6.2	Artrópodos plaga.....	19
6.3	Ácido jasmónico	22
6.4	Regiones promotoras	24
7.	METODOLOGÍA Y ÁREA DE ESTUDIO.....	26
7.1	Análisis Fenotípico.....	26
7.1.1	Sitio de trabajo y material vegetal	26
7.1.2	Colecta de artrópodos plaga	26
7.1.3	Ensayos a libre y a no libre escogencia	28
7.1.4	Análisis estadístico	31
7.2	Análisis molecular de la interacción planta-artrópodo	31
7.2.1	Análisis in silico.....	31
7.2.2	Análisis de expresión de genes	32
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
8.1	Analisis fenotípico	35
8.1.1	Oviposición <i>Mononychellus tanajoa</i>	35
8.2	Análisis molecular	40
8.2.1	Analisis <i>in silico</i>	40
8.2.2	Análisis de expresión de genes	53
9.	CONCLUSIONES	69
10.	BIBLIOGRAFÍA	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de la mosca blanca *Aleurotrachelus socialis* (Arias, 1995).

Figura 2. Estructura de tres diferentes jasmonatos. Fuente: Bucio *et al.*, 2012.

Figura 3. Vía de síntesis de los jasmonatos. Fuente: Bucio *et al.*, 2012.

Figura 4. Diseño experimental, bioensayo ácaro verde. A. Ensayo a libre escogencia, B. Parte de un lóbulo infestado con ácaros, C y D. Ensayo a no libre.

Figura 5. Diseño experimental, bioensayo mosca blanca. A. Ensayo a libre escogencia, B. Ensayo a no libre escogencia.

Figura 6. Modelo de cajas y bigotes, número de huevos según genotipo y día, bioensayo a no libre escogencia. 1dM: Día uno en la mañana; 1dT: Día uno en la tarde; 2dM: Día dos en la mañana; 2dT: Día dos en la tarde; 3dM: Día tres en la mañana; 3dT: Día tres en la tarde; 4dM: Día cuatro en la mañana; 4dT: Día cuatro en la tarde; 5dM: Día cinco en la mañana; 5dT: Día cinco en la tarde.

Figura 7. Curva de oviposición de los dos genotipos CMC 40 y Ecu 72, bioensayo a no libre escogencia.

Figura 8. Resultados del mejor modelo encontrado (en función polinómica del tiempo en potencia dos), bioensayo a no libre escogencia.

Figura 9. Modelo de cajas y bigotes, número de huevos según genotipo y día, bioensayo a libre escogencia. 1dM: Día uno en la mañana; 1dT: Día uno en la tarde; 2dM: Día dos en la mañana; 2dT: Día dos en la tarde; 3dM: Día tres en la mañana; 3dT: Día tres en la tarde; 4dM: Día cuatro en la mañana; 4dT: Día cuatro en la tarde; 5dM: Día cinco en la mañana; 5dT: Día cinco en la tarde.

Figura 10. Curva de oviposición de los dos genotipos CMC 40 y Ecu 72, bioensayo a libre escogencia.

Figura 11. Resultados del mejor modelo encontrado (en función polinómica del tiempo en potencia dos), bioensayo a libre escogencia.

Figura 12. Experimentos evaluados para la búsqueda de genes relacionados con la vía del ácido jasmonico.

Figura 13. Candidatos a genes de referencia sin genes diana.

Figura 14. Candidatos a genes de referencia con los 5 genes diana.

Figura 15. Análisis del gen UBQ10 como candidato a gen de referencia.

Figura 16. Árboles filogenéticos de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta*. A. Arbol filogenético del gen AOS, B. Arbol filogenético del gen CEV1, C. Arbol filogenético del gen MYC2, D. Arbol filogenético del gen OPR2, E. Arbol filogenético del gen LOX2.

Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 2% del Touchdown de los genes LOX2 y MYC2 para determinar la efectividad de los primers.

Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gradiente de temperatura de los primers AOS, CEV1, LOX2 y MYC2.

Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gradiente de temperatura del primer MYC2.

Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gradiente de temperatura del primer G3PDH.

Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gradiente de temperatura del primer UBQ10 y OPR2.

Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen AOS. 0h: Cero horas; 6h: Seis horas; 24h: Veinticuatro horas; 4d: Cuatro días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.

Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen CEV1. 0h: Cero horas; 6h: Seis horas; 24h: Veinticuatro horas; 4d: Cuatro días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible

Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen MYC2. 0h: Cero horas; 6h: Seis horas; 24h: Veinticuatro horas; 4d: Cuatro días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible

Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen LOX2. 0h: Cero horas; 6h: Seis horas; 24h: Veinticuatro horas; 4d: Cuatro días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.

Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen OPR2. 0h: Cero horas; 6h: Seis horas; 24h: Veinticuatro horas; 4d: Cuatro días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible

Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen G3PDH. 0h: Cero horas; 6h: Seis horas; 24h: Veinticuatro horas; 4d: Cuatro días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.

Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen UBQ10. 0h: Cero horas; 6h: Seis horas; 24h: Veinticuatro horas; 4d: Cuatro días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible

Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen AOS en la interacción mosca blanca - yuca. Cero horas; 24h: Veinticuatro horas; 48h: Cuarenta y ocho horas; 5d: Cinco días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible

Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen CEV1 en la interacción mosca blanca - yuca. 0h: Cero horas; 24h: Veinticuatro horas; 48h: Cuarenta y ocho horas; 5d: Cinco días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente.

Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen CEV1 en la interacción mosca blanca - yuca. Cero horas; 24h: Veinticuatro horas; 48h: Cuarenta y ocho horas; 5d: Cinco días; 8d: Ocho días; CMC 40: Variedad susceptible.

Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen MYC2 en la interacción mosca blanca - yuca. Cero horas; 24h: Veinticuatro horas; 48h: Cuarenta y ocho horas; 5d: Cinco días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible

Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen LOX2 en la interacción mosca blanca - yuca. 0h: Cero horas; 24h: Veinticuatro horas; 48h: Cuarenta y ocho horas; 5d: Cinco días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.

Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen LOX2 en la interacción mosca blanca - yuca. Cero horas; 24h: Veinticuatro horas; 48h: Cuarenta y ocho horas; 5d: Cinco días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.

Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen G3PDH en la interacción mosca blanca - yuca. 0h: Cero horas; 24h: Veinticuatro horas; 48h: Cuarenta y ocho horas; 5d: Cinco días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.

Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen UBQ10 en la interacción mosca blanca - yuca. 0h: Cero horas; 24h: Veinticuatro horas; 48h: Cuarenta y ocho horas; 5d: Cinco días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Sitios de colecta de artrópodos plaga en los municipios de Acacias, San Martín de los Llanos, El Dorado, El Castillo y San Luis de Cubarral

Tabla 2. Genes de trabajo y sus secuencias de primers usados para el análisis molecular.

Tabla 3. Elementos *cis* encontrandos en los genes asociados a la vía del ácido jasmonico.

Tabla 4. Clasificación de los motivos *cis* encontrados en los genes asociados a la vía del ácido jasmonico.

Tabla 5. Resultados del análisis semi cuantitativo de la interacción ácaro verde – yuca.

Tabla 6. Resultados del análisis semi cuantitativo de la interacción mosca blanca – yuca.

1. INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es esencial en la dieta y una de las fuentes más importantes de calorías para alrededor de 750 millones de personas en países tropicales en vías de desarrollo (Nhassico *et al.*, 2008; Stupak *et al.*, 2006; Hasibuan y Nazir, 2017). Además de su importancia como alimento, también se utiliza en la industria de productos procesados, alimento para animales, etanol y almidón (Jansson *et al.*, 2009; Ceballos *et al.*, 2006). Cultivada en aproximadamente 180 países, cerca de 53,6 millones de hectáreas cultivadas y una respectiva producción de 752,6 millones de toneladas. No obstante este cultivo se ve afectado por alrededor de 200 especies de artrópodos que atacan este cultivo, entre estas el ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) y la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*) (Bellotti *et al.*, 2012).

El ácaro verde se considera una de las más importante por reducir hasta un 53% el rendimiento de las raíces frescas en cultivares susceptibles y por su coevolucion con la yuca hasta llegar al punto de adaptarse a las barreras físicas y químicas que son la defensa natural de la planta (Marín, 2015). Según las condiciones ambientales, edad de la planta, tipo y duración del ataque y la fertilidad del suelo será el nivel de daño producido por el ácaro verde a los cultivos de yuca. El ácaro verde puede causar pérdidas considerables en la producción de la raíz, perdidas de rendimiento por el ataque a las hojas, reducción de la actividad fotosintética, entre otras, con llevando a la pérdida económica de muchos pequeños agricultores que dependen de este cultivo.

La mosca blanca se considera una de las plagas que más estresa a la planta y que afecta por lo tanto la sostenibilidad de esta (Dalton, 2006). En la yuca, la mosca blanca se alimenta directamente de la planta, incluso podría desaparecer un cultivo entero. Una gran cantidad de estas moscas conlleva a la aparición de otras epidemias como los virus, siendo vectores de enfermedades como la del mosaico de la yuca (CMD) y la del rayado marrón (CBCD). La principal estrategia de defensa que utilizan los agricultores es la aplicación de insecticidas, lo que es contraproducente ya que el uso continuo provocaría que la mosca genere resistencia a este tipo de productos químicos (Faria y Wraight, 2001; Marín, 2015).

El ácido jasmónico y sus derivados conocidos como jasmonatos, son fitohormonas de origen lipídico. Sirven como señalizadores de respuesta frente a diferentes estreses, entre estos, ataque de artrópodos plaga, patógenos, heridas (Ueda y Nishi, 2006; Howe y Browse, 2009). La señalización por jasmónatos es crucial en la activación de las respuestas de defensa en contra de herbívoros e insectos (Browse, 2005). Esta vía es activada por herbivoría y heridas causadas por un daño mecánico. Además de participar en la defensa de las plantas, los jasmonatos también tienen un rol en el crecimiento de la raíz, la maduración de frutos, la tuberización, el desarrollo del polen, el enrollamiento de zarcillos, la senescencia (Turner *et al.*, 2002; Farmer *et al.*, 2003; Rojo *et al.*, 2003; ; Bari y Jones, 2009). El presente trabajo tiene como objetivo principal evaluar la expresión de genes relacionados con la vía de señalización del ácido jasmónico frente al ataque de dos artrópodos plaga en yuca.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es una de las fuentes más importantes de calorías para alrededor de 750 millones de personas, se cultiva principalmente en regiones tropicales y en suelos marginales, infértiles, ácidos y expuestos a largos periodos de sequía (Nhassico *et al.*, 2008; Stupak *et al.*, 2006; Suárez & Mederos, 2011; Mederos, 2006). Este cultivo se ve afectado por un complejo de plagas que puede dividirse en dos grupos: las que probablemente han coevolucionado con la yuca siendo esta su huésped primario; y, aquellos que atacan cultivo esporádicamente o de forma oportunista. Las plagas que causan más pérdidas económicas y/o de rendimiento son por lo general aquellas que han co-evolucionado con el cultivo, como lo son, la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*), los ácaros (*Mononychellus tanajoa*), cochinillas, y otros como el chinche de encaje, chinche subterráneo, piojo harinoso, etc. (Bellotti, 2002; Bohórquez, 2011). Algunas plagas atacan los cogollos y hojas disminuyendo el crecimiento de la planta y afectando el área fotosintéticamente activa. Otros, atacan tallos impidiendo el transporte normal de los nutrientes. Y algunos artrópodos como la mosca blanca, son vectores de enfermedades como la del mosaico de la yuca (CMD) y la del rayado marrón (CBCD) (Legg y Fauquet, 2004; Patil y Fauquet, 2009). En la mayoría de las regiones productoras, el ácaro verde (*M. tanajoa*), es el responsable del daño durante la época seca y por lo tanto produce graves pérdidas económicas, al disminuir la calidad y producción en el cultivo (Ramírez *et al.*, 2010; Bellotti, 2002). Los daños del ácaro se caracterizan por generar punteados amarillentos que se extienden en el tejido y dan un aspecto moteado y bronceado (característico del mosaico), las hojas se desarrollan con malformaciones; cuando el ataque es extenso el área foliar se reduce en una alta proporción; el tallo adquiere un aspecto áspero y marrón, finalmente, la parte superior de la planta toma forma como de lanceta (Ramírez *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2002). Ensayos experimentales en Colombia han mostrado que los ácaros llegan a reducir el rendimiento de raíces frescas en cultivares susceptibles en un 21, 25 y 53% durante un ataque de 3, 4 y 6 meses, respectivamente, y en un 15% en los cultivares resistentes (Bellotti, 2008; Bellotti *et al.*, 1999; Herren y Neuenschwander, 1991).

La mosca blanca es una plaga que causa daños importantes en el cultivo de la yuca en America, Africa y Asia ya sea alimentándose directamente o siendo vector de graves enfermedades (CMD, CBCD). En el neotropico se han registrado 11 especies que conforman un gran complejo; *Aleurotrachelus socialis* es la más importante con una distribución amplia en el norte de América del Sur: Colombia, Ecuador y Venezuela (Bellotti *et al.*, 2005; Trujillo *et al.*, 2004). Los daños causados por el ataque de *A. socialis* tienen una importancia económica en Colombia, basada en el rendimiento de las raíces y la disponibilidad de estacas para la siembra. La mosca blanca se alimenta del floema de las hojas, produce clorosis y caída de las mismas, afectando el rendimiento en la producción de raíces si el ataque se mantiene. Bellotti y colegas reportaron en el 2012 una correlación entre la duración del ataque de *A. socialis* y las pérdidas en la producción de raíces, a saber, infestaciones de 1, 6 y 11 meses, pueden reducir el rendimiento en 5, 42 y 79%, respectivamente.

Por consiguiente, el ataque de los artrópodos plaga (ácaro verde y mosca blanca) generan una pérdida en el rendimiento y producción de la yuca, lo que hace más difícil poder

cosecharla, originando problemas para las poblaciones humanas que dependen de este cultivo, ya que este proporciona la mayor parte de calorías en la dieta para cientos de millones de hogares; igualmente, la yuca tiene potencial como cultivo industrial y como generador de ingresos (Gedil *et al.* 2012).

El ácido jasmónico es considerado una fitohormona que actúa como una molécula de señalización en las plantas frente a daños causados por herbívoros y patógenos (Deuner *et al.*, 2015; Wasternack y Hause, 2013). También, actúan en la señalización de las interacciones entre las plantas y microorganismos beneficiosos ligados a la raíz (Pieterse *et al.*, 2009). De igual forma, regula la apertura estomática, la inhibición del crecimiento de la raíz, la maduración del fruto, la germinación de las semillas, el enrollamiento del zarcillo, la senescencia y las respuestas de la planta ante las heridas (Bari y Jones, 2009). Además, los genes *LOX2*, *AOS*, *OPR2*, *CEV1* y *MYC2* actúan directamente sobre esta vía de señalización, permitiendo y/o inhibiendo la síntesis del ácido jasmónico (Yan *et al.*, 2013). Por lo tanto, sumado a las problemáticas antes mencionadas, la falta de información relacionada con los mecanismos de defensa de esta planta, como la vía de señalización del ácido jasmónico en yuca, aún se desconoce, ignorando la dinámica de la expresión génica que interviene en esta vía de señalización y por consiguiente no permite trazar objetivos más audaces que conlleven a comprender mejor las causas y respuestas de esta vía para posteriormente ser aplicadas a este cultivo de alto valor económico. En función de lo dicho anteriormente, la pregunta de investigación que se quiere responder es; ¿Cómo es la expresión génica de los genes *LOX2*, *AOS*, *OPR2*, *CEV1* y *MYC2* asociados a la vía de señalización del ácido jasmónico frente al ataque del ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) y la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*) en yuca (*Manihot esculenta* Crantz)?

3. HIPÓTESIS

H1: Los cinco genes relacionados con la vía del ácido jasmónico tienen expresión diferencial en respuesta al ataque tanto del ácaro verde como de la mosca blanca.

H2: Los cinco genes relacionados con la vía del ácido jasmónico tienen expresión diferencial en respuesta al ataque de un solo artrópodo plaga ya sea el ácaro verde o la mosca blanca.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la expresión de genes relacionados con la vía de señalización del ácido jasmónico frente al ataque de dos artrópodos plaga en yuca.

4.2 Objetivos específicos

- Establecer la preferencia de *Aleurotrachelus socialis* y *Mononychellus tanajoa* sobre dos genotipos de yuca (CMC 40 y Ecu 72), evaluando el efecto de la oviposición.
- Evaluar la expresión de cinco genes (*LOX2*, *AOS*, *CEV1*, *OPR2* y *MYC2*) relacionados con la vía de señalización del ácido jasmónico ante el ataque de *Aleurotrachelus socialis* y *Mononychellus tanajoa* en yuca.

5. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) constituye una de las principales fuentes de energía y producción de carbohidratos más eficiente por unidad de área de todo el trópico (Soto *et al.* 2006). La producción mundial de yuca es de alrededor de 203 millones de toneladas de raíces frescas con un rendimiento promedio de 10.9 tha⁻¹ (Suarez y mederos, 2011). Por ende, esta planta es de gran interés económico, y es gracias a su raíz, la cual es utilizada en cuatro tipos de mercado, para consumo humano, para producción de harina seca, para consumo animal y como producto intermedio en la industria no alimenticia (Suarez y mederos, 2011). Las plagas como el ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) y la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*) generan grandes pérdidas en el rendimiento de la yuca, limitando y afectando a su vez los cuatro mercados mencionados anteriormente. Las investigaciones sobre el control del ácaro verde se han centrado en dos estrategias, una es la resistencia de la planta hospedera y la otra el control biológico. Las dos se complementan reduciendo las poblaciones de ácaros y por lo tanto disminuyendo las pérdidas económicas. Con la evaluación de algunos genes (*LOX2*, *AOS*, *OPR2*, *CEV1* y *MYC2*) implicados en la vía de señalización del ácido jasmónico en dos diferentes genotipos de yuca, se podría fortalecer la primera estrategia sobre el control del ácaro. El CIAT junto con AGROSAVIA/Colombia han evaluado cerca de 5000 clones de yuca desde 1980, con el objetivo de encontrar resistencia a la mosca blanca (*A. sociales*), arrojando que el clon ECU 72 tiene un alto nivel de resistencia. Según estudios de campo e invernadero, las moscas blancas (*A. sociales*) que se alimentaban de variedades resistentes como ECU 72 mostraron menos oviposición, largos periodos de desarrollo, reducción en el tamaño y un alto porcentaje de mortalidad en comparación a las alimentadas con variedades susceptibles (Bellotti *et al.*, 2009). Evaluar la expresión génica de cinco genes (*LOX2*, *AOS*, *OPR2*, *CEV1* y *Myc*) relacionados con la vía de señalización del ácido jasmónico frente al ataque de *A. socialis* en dos genotipos diferentes, uno resistente (ECU 72) y otro susceptible (CMC 40), permitirá comparar las diferencias existentes con respecto a los niveles de expresión de los dos genotipos y cómo estos resultados se relacionan con los encontrados en los estudios de invernadero. Los jasmonatos son importantes ya que participan en el crecimiento de la raíz, la maduración de frutos, la tuberización, el desarrollo del polen, el enrollamiento de zarcillos, la senescencia y por supuesto en la defensa de las plantas (Turner *et al.*, 2002; Farmer *et al.*, 2003; Rojo *et al.*, 2003; Bari y Jones, 2009). La señalización por jasmonatos es crucial en la activación de las respuestas de defensa en

contra de herbívoros e insectos (Browse, 2005; Kautz *et al.*, 2014). Esta vía es activada por herbivoría y heridas causadas por un daño mecánico. La activación ocurre mediante la expresión de ciertos genes que codifican proteínas relacionadas con la síntesis, percepción de jasmonatos, flujo de iones y adaptación al estrés en general (Reymond *et al.*, 2000). La vía del ácido jasmónico (AJ) se ha estudiado muy poco en la yuca, por tal razón dilucidar la expresión diferencial de los genes que se activan frente al ataque de artrópodos plaga constituye una primera aproximación para entender este mecanismo de defensa y permitirá proponer estrategias de fitomejoramiento que potencien la capacidad de resistencia en la planta. Una manera de alcanzar lo anterior es evaluando los cinco genes (LOX2, AOS, OPR2, CEV1 y MYC2) propuestos en éste trabajo, que actúan en la biosíntesis del AJ, como reguladores y activadores transcripcionales.

No obstante, los procesos complejos que ocurren en las células dependen de acciones sincrónicas de diferentes grupos de genes. La coordinación de la expresión génica se logra gracias a diferentes mecanismos de control de la transcripción que son particulares para cada gen. Entre estos está el tiempo, la velocidad y el nivel de transcripción. Los promotores son aquellas regiones genómicas que contienen muchas de aquellas señales reguladores y por lo general, los se encuentran ubicados aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción (Steffens *et al.*, 2004, Prochnik *et al.*, 2012). Una determinación precisa de los promotores puede ayudar a identificar nuevos genes; complementar la anotación de genes conocidos e identificar su límite 5', pronosticar transcripciones alternativas iniciadas por otros posibles promotores; ubicar la región de control de mayor importancia para la activación de los genes; observar patrones de regulación transcripcional y por último determinar modelos de promotores basados en la organización de estos en diferentes grupos de genes, teniendo este último un papel importante para establecer las relaciones causa-consecuencia características de diferentes redes reguladoras de genes y vías de activación. Determinar cuándo y cómo ocurre la activación y desactivación de los genes es un reto en la era post-genómica. Se puede llegar a comprender más la diferencia entre dos especies analizando la expresión y regulación génica que con base en sus estructuras (Howard y Benson, 2002). Las complejas vías metabólicas presentes en diversos organismos, como la diferenciación celular, la respuesta celular al cambio ambiental y las respuestas de defensa de las plantas frente a artrópodos plaga, de interés aquí, pueden comprenderse adecuadamente por medio del estudio de las secuencias promotoras (Jáuregui *et al.*, 2003; Pandey y Krishnamachari, 2006). Con base en lo establecido anteriormente, la importancia de analizar y determinar la ubicación de los promotores

ayudará a comprender el control molecular de la expresión de los genes evaluados en este trabajo. El éxito de ésta investigación generará información clara y específica que ayudará a futuros científicos interesados en la producción, mecanismos de defensa, rendimiento y otros factores de la yuca, y muy posiblemente aumentará la relación producción/rendimiento de cultivos. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo es evaluar la expresión de genes relacionados con la vía de señalización del ácido jasmónico frente al ataque de dos artrópodos plaga en yuca.

6. MARCO TEÓRICO

6.1 El cultivo de yuca

La yuca, *Manihot esculenta* Crantz, es una planta dicotiledónea perenne con reproducción sexual, monoica, de hábito arbustivo simpodial y raíces ricas en carbohidratos que pertenece a la familia Euforbiaceae y único miembro de esta familia que es cultivado como alimento (Cadavid, 2005; Fauquet, 1990). El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), ha trabajado arduamente en investigaciones que están relacionadas con la construcción de mapas y QTLs asociados a características de interés en yuca (Jorge et al., 2000; Ferguson et al., 2012). De igual forma, también ha sido utilizada como modelo de investigación en estudios de biotecnología, biocombustible, identificación de defensas naturales y de genes frente al ataque de artrópodos plaga (Cortés et al., 2010; Burbano et al., 2007; Bellotti et al., 2003). Debido a la propiedad de acumular almidón en sus raíces, la yuca presenta un elevado componente calórico, por lo tanto, la productividad se mide en términos de materia seca: 30 a 40% en condiciones de producción normal, y hasta un 85% de materia seca que se almacena en la raíz es almidón. El contenido de proteínas es pobre, solo 1 a 2% en peso fresco, pero rico en vitamina C y calcio. Los niveles de vitaminas A y B y varios minerales son aceptables. A pesar de que las dietas basadas en almidón de yuca solo proporcionan el 30% de vitaminas y minerales diarios requeridos, este cultivo se considera una de las principales fuentes energéticas para muchas poblaciones humanas (Marín, 2015).

6.2 Artrópodos plaga

La mosca blanca, *Aleurotrachelus socialis* Bondar, 1923, es un hemíptero que pertenece a la familia Aleyrodidae, con hábito polífago y que se ha desarrollado junto con los cultivos alimenticios durante siglos. La mosca se alimenta del floema de las plantas haciendo que éstas se debiliten, además debido al exceso de líquido ingerido, los insectos excretan una melaza que a su vez estimula el crecimiento de hongos como *Cladosporium* sp y *Capnodium* sp, conocidos como fumagina. También, puede causar daños al alimentarse directamente del follaje, entre los más comunes están: debilitamiento, amarillamiento, deformación del follaje y defoliación (Bellotti, 2002).

La mosca blanca presenta una metamorfosis incompleta. Los huevos de *A. socialis* tienen forma de banano, con una longitud de 0,08mm y 0,035mm de diámetro, estos son depositados en el envés de las hojas y debido a su tamaño, pueden verse como si de un polvo blanco se tratara. Cada hembra puede poner entre 180-200 huevos en todo su ciclo de vida. Su tiempo de incubación es de ~10 días, con tres instares ninfales y una fase de pupa antes del estado adulto. A partir del tercer instar el cuerpo pasa de un color crema a uno negro, rodeado de una capa blanca cerosa, lo que hace que sea más fácil diferenciarlos de otras especies (Arias, 1995) (Figura 1).



Figura 1. Ciclo de vida de la mosca blanca *Aleurotrachelus socialis* (Arias, 1995).

Carabali y colegas estudiaron en el 2008 el desarrollo y reproducción de una especie de mosca blanca perteneciente a la misma familia de *A. socialis* (Aleyrodidae), se trata de *Bemisia tabaci*. La tasa de oviposición, la cual se evaluó con bioensayos controlados bajo condiciones de 70 ± 5 HR. 12L:12O, para el cultivar CMC 40 fue la más baja (0,49 huevos/hembra/2 días) comparada con CG489-34 (0,86) y MEcu72 (0,89), todo esto a pesar de que las longevidades medias eran muy similares entre los tres genotipos; 6,3 días para MEcu72, 5,07 para CG489-34 y 3,9 para CMC 40.

Igualmente, Carabalí y colaboradores en el 2010 estudiaron la resistencia a la mosca blanca, *A. socialis*, en poblaciones silvestres de yuca, *M. tristis*. Estudiaron dos accesiones del progenitor salvaje y los compararon con la variedad CMC 40 y Ecu 72. Encontraron que la longevidad promedio de las accesiones y la tasa de oviposición de la mosca no eran significativamente diferentes de las de Ecu 72, mientras que las de CMC 40 fueron las más altas. Los resultados finales concluyeron que las accesiones silvestres mostraron niveles importantes de resistencia a *A. socialis*.

Una manera de controlar las poblaciones de mosca blanca es generar variedades resistentes, tomando genes de los parentales silvestres de *Manihot*, los cuales son fuentes de estos contra las plagas para las especies cultivadas de yuca. Carabalí y colegas (2010) se encargaron de caracterizar esta nueva fuente de resistencia, teniendo en cuenta la biología y demografía de *A. socialis* en 8 accesiones de *M. flabellifolia*, control susceptible (CMC 40) y control resistente (MEcu72). Siguiendo esa misma línea de investigación el objetivo del trabajo realizado por Akimbo *et al.* (2012), fue introgresar genes de los progenitores silvestres de yuca a la comercial (*M. esculenta*) y así aumentar la resistencia frente al ataque de la mosca blanca.

También, Zhang y colaboradores (2013) encontraron que la vía de señalización del jasmonato y etileno median la interferencia inducida por la mosca blanca (*B. tabaci*) con la defensa indirecta de plantas en *Arabidopsis thaliana*. Además, encontraron que la alimentación de las moscas blanca suprime la señalización del ácido jasmónico mediante

la inducción de la señalización del ácido salicílico (Zhang *et al.*, 2013).

Se ha estudiado la resistencia de especies de *Manihot* a *Mononychellus tanajoa*, *Aleurotrachelus socialis* y *Phenacoccus herreni*, encontrando que los genotipos *M. flabellifolia* y *M. peruviana* presentan altos niveles de resistencia frente al acaro verde y la mosca blanca (Burbano *et al.* 2007).

El ácaro verde, *Mononychellus tanajoa* (Bondar), es un artrópodo perteneciente a la familia Tetranychidae. Se reproduce mediante partenogénesis tipo arrhenotokous, que consiste en la formación de machos a partir de óvulos no fertilizados, con cuatro etapas activas: la etapa larval de seis patas, dos estadios ninfales y una etapa adulta (Marín, 2015). El ácaro verde se encuentra ampliamente distribuido por América del Sur y América Central, representando el 99% de los registros, Colombia y Venezuela son los países mejores representados. Solamente se habla de cuatro especies del género *Mononychellus*, cerca del 61% de los registros corresponden a *M. tanajoa*, seguido de *M. caribbeanae* (McGregor) con un 25%, 10% para *M. mcgregori* (Flechtmann and Baker) y 2% para *M. planki* (McGregor) (Vasquez y Parsa, 2014).

Las hembras del ácaro verde (*M. tanajoa*) suelen ovipositar en diferentes partes de la hoja en el envés, a lo largo de la vena principal, venas secundarias o en las mismas cavidades de las hojas. La preoviposición dura de 1 a 3 días y el número de huevos oscila entre 15 y 111. En condiciones de laboratorio la duración para los diferentes estados es: huevo 3 a 5 días; larva 1 a 2 días; protoninfa 1 a 2 días; deutoninfa 1 a 2 días y adultos más de 30 días (Bellotti, 1983). Una investigación realizada por Strucker *et al.* (2017) tuvo como objetivo evaluar la preferencia del ácaro verde *M. tanajoa* sobre la alimentación y oviposición en 30 genotipos de yuca. Los resultados mostraron que los cultivares Amazonas, Recife, Pão y Cigana preta presentaron una baja frecuencia de oviposición, igualmente, estos tres últimos cultivares presentaron baja preferencia del ácaro a la hora de alimentarse.

Esta plaga, *M. tanajoa*, se ha estudiado desde dos enfoques, la resistencia de la planta hospedante y el control biológico. La unión de estas dos estrategias reduce al mínimo las poblaciones del ácaro (Ospina y Ceballos, 2002). Un estudio realizado en el laboratorio de entomología - Embrapa Yuca y Frutas en Brasil tuvo como objetivo ver la disimilitud genética que hay entre especies domesticadas y silvestres de yuca con respecto a la resistencia al ácaro verde, teniendo en cuenta la duración del ciclo biológico de este mismo. Al asociar la duración del ciclo más largo de *M. tanajoa* con la más baja viabilidad larva-adulto se infirió que una accesión de una especie silvestre (GLA-19-DF) es más resistente al desarrollo del ácaro (en la yuca) que otras accesiones, incluyendo silvestres y domesticas (Boaventura *et al.*, 2015).

La resistencia al ácaro verde también se ha investigado evaluando variedades híbridas interespecíficas y especies silvestres de *Manihot* como fuentes de resistencia, mediante estudios biológicos en laboratorio y evaluaciones en campo, mostrando que existe una variabilidad genética significativa entre las variedades silvestres y las domesticas (Boaventura, 2013). La densidad poblacional del ácaro verde ha sido estudiada teniendo en cuenta factores bióticos y abióticos. El trabajo realizado por Rêgo *et al.*, (2013) escogió

como factor biótico el depredador del ácaro verde *Euseius ho* y como factores abióticos la lluvia, temperatura y humedad relativa. El estudio concluyó que los factores abióticos, principalmente la lluvia, fueron los responsables de que las densidades de *M. tanajoa* se impulsaran.

Ratlamwala en el 2014, estudió el ácaro araña (*T. urticae*), realizando experimentos de selección en *A. thaliana* con niveles variables de glucolinolatos de indol (IG), para determinar si los ácaros podrían adaptarse a IGs y otros compuestos de defensa. Luego de 12 meses de evaluación encontró que los ácaros se desempeñaron significativamente mejor en plantas de *A. thaliana* con IGs que en frijoles. No obstante, hubo una costosa adaptación. Los datos de qRT-PCR en diferentes líneas de ácaros revelaron que los genes de detoxificación, entre estos AOS y MYC2, solo pueden estar implicados en la respuesta de estrés general a los IG y los ácaros no interfieren con la respuesta de defensa de *A. thaliana*.

6.3 Ácido jasmónico

Los jasmonatos (el ácido jasmónico –AJ– y sus derivados), son compuestos de naturaleza lipídica, similares a las prostaglandinas de los animales (Jordán y casaretto, 2006; Alcalá *et al.*, 2017) (Figura 2). La síntesis de los jasmonatos es compleja, no solo por el número y tipo de procesos, sino también porque se lleva a cabo en distintos lugares de la célula.

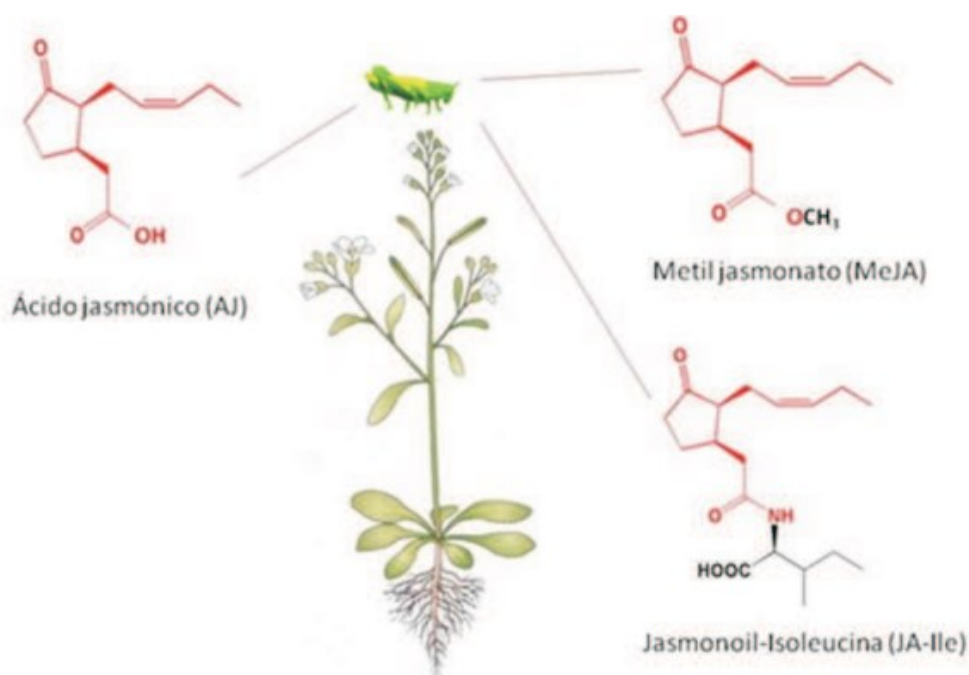


Figura 2. Estructura de tres diferentes jasmonatos. Fuente: Bucio *et al.*, 2012.

A partir del ácido linolénico, que se desprende de la pared celular por daño mecánico o por ataque de insectos, se inicia la producción de ácido jasmónico por medio de la vía de los octadecanoides. El AJ sintetizado en el peroxisoma es llevado al citoplasma y allí se impulsa

el sistema de degradación de proteínas, activador de los genes de defensa. El AJ forma un conjugado (JA-Ile) con isoleucina para poder actuar. Bajo condiciones normales, los niveles bajos de JA-Ile hacen que se concentren unas proteínas conocidas como JAZ, que inhiben la transcripción de genes relacionados con la defensa de la planta, sin embargo, el continuo ataque de los insectos y/o daño mecánico aumenta la producción del complejo JA-Ile y este a su vez activa el sistema de degradación de proteínas. Al destruir las proteínas JAZ, el factor de transcripción es liberado y la síntesis de compuestos de defensa o las proteínas responsables de la síntesis de estos compuestos pueden ser transcritos (Zavala, 2010). Los genes *LOX2* y *AOS* actúan como una lipoxigenasa y aleno óxido sintasa, respectivamente, y con un aleno óxido ciclasa (*AOC*) forman el ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), principal precursor de los jasmonatos, este se reduce gracias al gen *OPR3* para posteriormente sintetizar el AJ (Bucio *et al.*, 2012) (Figura 3). El gen *CEV1* actúa en las vías de AJ y de etileno como regulador de estas. El factor de transcripción *Myc* es un activador transcripcional del AJ y del ácido abscísico.

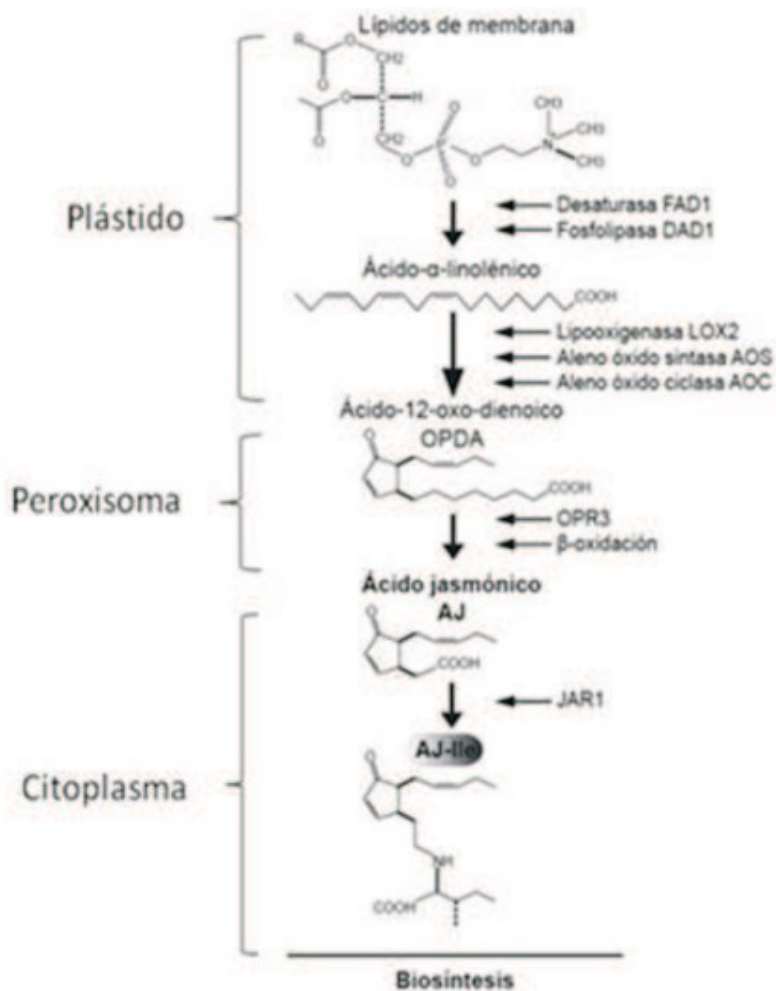


Figura 3. Vía de síntesis de los jasmonatos. Fuente: Bucio *et al.*, 2012.

Zhang *et al.*, demostraron en el 2012 que el MeJA está relacionado con el catabolismo de la Arginina y ayuda a que los frutos del tomate-cereza sean más tolerantes a los daños

causados por el frío. Plántulas de melón de alta resistencia a condiciones de estrés por medio de la síntesis de moléculas bioactivas específicas, se obtuvieron al aplicar jasmonatos sobre estas (Nafie *et al.*, 2011). En otro estudio realizado por Zhang y colegas (2018) demostraron que las defensas dependientes del ácido jasmónico son cruciales en la defensa del tomate contra las ninfas de *bemisi tabaci*, pero no en etapas adultas. Es bien sabido que en múltiples especies vegetales de interés económico y agronómico la aplicación exógena tanto de AJ como de MeJA ha estimulado la resistencia contra artrópodos plaga, como por ejemplo, el algodón, lechuga, papa, tabaco y tomate (Omer *et al.*, 2001; Halim *et al.*, 2006; Thaler *et al.*, 2001; Rohwer y Erwin, 2010).

Es por todo lo anterior, que es posible decir que los jasmonatos juegan un papel muy importante en la regulación de las respuestas de defensa a herbívoros. Esta afirmación está basada en numerosos estudios de campo y de laboratorio que muestran que los mutantes de JA están fuertemente asociados en resistencia a un amplio número de artrópodos plaga, dentro de los que se encuentran: escarabajos, trips (Thysanoptera), gorgojos (Coleoptera), orugas (Lepidoptera), saltamontes (Homoptera), ácaros (Acari) y algunas especies de Díptera y Heteroptera (Bostock, 2005; Howe, 2004; Kessler & Baldwin, 2002).

6.4 Regiones promotoras

Los promotores son secuencias de DNA que están ubicadas aguas arriba de la región del gen y su función está relacionada con la expresión génica (Gerhardt y Echeverrigaray, 2011). La regulación transcripcional en eucariotas está controlada especialmente por los factores de transcripción (FTs), estos están en frecuente interacción con elementos específicos del DNA, con la maquinaria de transcripción basal e incluso con otros factores de transcripción para regular la expresión de genes. Se han reportado más de 1500 FTs en plantas, cada uno con la capacidad de controlar la expresión de pocos o muchos genes por medio de complejas vías de señalización.

Los elementos cis o también llamados sitios de unión de factores de transcripción, TFBS (del inglés *Transcription Factor Binding Sites*), son elementos del DNA que tienen una función influyente en la actividad transcripcional de los genes (Riechmann *et al.*, 2000; Priest *et al.*, 2009). La región promotora por lo general se divide en tres partes: el promotor central, la cual se encuentra aproximadamente 35pb en sentido 5' del inicio de la transcripción; el promotor proximal, conformado por varios elementos reguladores y ubicada a unos cuantos cientos de pares de bases cadena arriba del codón de inicio; y por último el promotor distal, en esta región se encuentran los potenciadores y silenciadores de genes. Esta región se encuentra típicamente a miles de pares de bases corriente arriba del inicio de la transcripción (Bedoya & Bustamante, 2011).

Pérez y López (2013) realizaron un trabajo identificando elementos cis regulatorios y prediciendo factores de transcripción relacionados en la regulación de los miRNAs en plantas, mediante herramientas bioinformáticas. Trabajaron con 17 especies vegetales, identificando posibles regiones promotoras y analizando el rol de varios factores de transcripción en respuesta de defensa contra bacterias. Los resultados mostraron que 9 plantas presentaban diferencias significativas en la distribución de los TFBS de los

promotores de miRNAs con respecto a los encontrados en los genes que codifican proteínas. También lograron identificar sitios de unión presentes en promotores de miRNAs inducidos por la infección de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* que de igual forma se presentaban en regiones promotoras de genes implicados en respuesta al ciclo circadiano y a la luz, concluyendo que estos procesos podrían estar fuertemente coordinados.

Otro trabajo realizado con miRNAs, identificó computacionalmente estas pequeñas secuencias de RNA y sus blancos en *M. esculenta*. Al mismo tiempo encontraron elementos *cis* sensibles al estrés por sequía y motivos asociados a fitohormonas en las regiones promotoras de estos genes de miRNA (Patanum *et al.*, 2013)

Por otro lado, un análisis *in silico* de regiones promotoras de genes inducidos por frío en arroz (*Oryza sativa* L.) y *Arabidopsis thaliana* determinó que la mejor manera para estudiar la regulación de procesos celulares debe tener como objetivo principal la identificación de combinación de motivos, y, como segundo, buscar sitios de unión individuales que presenten sobrerrepresentación (Lindlöf *et al.*, 2009).

Otro trabajo que se realizó con arroz y *A. thaliana*, fue el elaborado por *Ibraheem et al.* (2010), el cual consistió en analizar *in silico* elementos reguladores en *cis* en regiones 5' reguladoras de la familia de genes encargados del transporte de sacarosa. Usando las bases de datos Plant CARE, PLACE y Genomatix MatInspector, predijeron los elementos reguladores que actúan en *cis*, por medio de un escaneo de 1,5kpb de la región 5' de los genes transportadores de sacarosa desde el codón de inicio de la traducción. Los resultados efectivamente mostraron la identificación de elementos reguladores que actúan en *cis*, relacionados con varias vías metabólicas y de señalización, con sus respectivas frecuencias de presencia. Otro estudio que utilizó Plant CARE para predecir potenciales elementos *cis* lo realizaron Chen y colegas en el 2013, encontrando que la proteína quinasa interactiva CBL (CIPK6) está involucrada en la respuesta de la planta al estrés salino/osmótico y al ácido abscísico.

Ha y Wyckhuys (2017) identificaron y caracterizaron familias genéticas de lectina (proteína importante en la defensa de las plantas y la señalización celular) a partir del análisis de la región promotora, encontrando que la mayoría de las familias respondían a condiciones de luz y presentaban una expresión específica según el órgano o tejido de la planta. Además, la presencia de elementos *cis* asociados con hormonas, como el ácido jasmonico, en las regiones promotoras de todos los genes de lectina indicaron su importancia en la respuesta a la señalización y estrés del cultivo.

7. METODOLOGÍA Y ÁREA DE ESTUDIO

7.1 Análisis Fenotípico

7.1.1 Sitio de trabajo y material vegetal

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular adscrito al Centro de Recursos Genéticos de la Orinoquia Colombiana (CRGOC) y en el laboratorio de Biotecnología, ubicados en la Universidad de los Llanos-campus Barcelona. Se trabajó con dos genotipos de yuca, CMC 40 y Ecu 72, los cuales presentan respuestas contrastantes frente al ataque del ácaro verde y la mosca blanca; CMC 40 siendo susceptible y Ecu 72 resistente. Cerca de 30 plántulas fueron propagadas y dejadas en un cuarto de crecimiento con una temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $70 \pm 5\%$ RH y 12 horas de fotoperiodo, durante tres meses. Luego, estas plantas se trasplantaron a bolsas con suelo esterilizado, en relación 2:1 de abono y tierra, y ubicadas en el invernadero para su aclimatación, posteriormente fueron llevadas al laboratorio de biología molecular para llevar a cabo la evaluación fenotípica y el análisis molecular de la infestación.

7.1.2 Colecta de artrópodos plaga

Los artrópodos plaga se colectaron en cultivos de yuca ubicados en los municipios de Acacias, San Martín de los Llanos, El Castillo, El dorado y San Luis de Cubarral (Tabla 1). Los ácaros verdes se colectaron al cortar hojas con presencia del artrópodo y posteriormente se llevaron al laboratorio de biología molecular para infestar plantas del genotipo CMC 40 y así establecer una colonia. La colecta de la mosca blanca se realizó gracias a aspiradores entomológicos manuales, los cuales atrapaban las moscas y las depositaba en un frasco con hojas de yuca para posteriormente establecer la colonia en genotipos susceptibles. La crianza de los artrópodos plaga se realizó bajo condiciones controladas ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 5\%$ HR y 12 h de fotoperiodo) en el laboratorio de biología molecular y biología de la universidad de los Llanos.

Tabla 1. Sitios de colecta de artrópodos plaga en los municipios de Acacias, San Martín de los Llanos, El Dorado, El Castillo y San Luis de Cubarral.

País	Departamento	Municipio	Localidad	Latitud decimal	Longitud decimal	Elevación (m)
Colombia	Meta	Acacias	Vereda Sardinata	04°00'55,3"	73°43'53,5"	515
Colombia	Meta	Acacias	Vereda El Rosario, Finca El Recuerdo	04°01'15,2"	73°42'33,0"	502
Colombia	Meta	Acacias	Vereda Margarita, Finca El Triunfo	04°01'14,6"	73°42'31,2"	510

Colombia	Meta	San Martín de los Llanos	San Cayetano	03°45'30,6"	73°43'29,6"	467
Colombia	Meta	San Martín de los Llanos	Vereda Llano Grande	03°41'58,8"	73°40'36,6"	410
Colombia	Meta	El Dorado	Centro poblado San Isidro del Ariari	03°44'51,2"	73°49'52,4"	524
Colombia	Meta	El Dorado	Centro poblado Pueblo Sánchez	03°40'59,1"	73°47'48,6"	435
Colombia	Meta	El Dorado	Vereda Santa Rosa Baja, Escuela	03°45'42,1"	73°50'44,5"	546
Colombia	Meta	El Dorado	Centro poblado San Isidro del Ariari	03°44'51,2"	73°49'52,4"	524
Colombia	Meta	El Dorado	Centro poblado San Isidro del Ariari	03°42'54,0"	73°48'31,7"	472
Colombia	Meta	El Dorado	Centro poblado San Isidro del Ariari	03°42'16,03"	73°48'14,68"	461
Colombia	Meta	El Castillo	Corregimiento Medellín del Ariari, Vereda Caño Tigre	03°37'57,4"	73°48'16,4"	401
Colombia	Meta	El Castillo	Corregimiento Medellín del Ariari, Vereda Caño Tigre	03°37'24,7"	73°48'08,6"	395
Colombia	Meta	El Castillo	Vereda Playa Rica	03°36'14"	73°47'49,4"	382
Colombia	Meta	El Castillo	Vereda Caño Brasil, a 1.3 Km de la Vereda La Floresta	03°34'57,3"	73°37'47,4"	369
Colombia	Meta	El Castillo	Corregimiento Medellín del Ariari, Vereda Caño Tigre	03°37'24,7"	73°48'08,6"	395
Colombia	Meta	El Castillo	Vereda Caño Brasil, a 1.3 Km de la Vereda La Floresta	03°34'57,3"	73°37'47,4"	369

Colombia	Meta	San Luis de Cubarral	Vereda Puerto Ariari	03°47'22,2"	73°50'37,9"	591
Colombia	Meta	San Luis de Cubarral	Vereda Marayal, Finca La Reserva	03°47'29,2"	73°47'06,5"	507
Colombia	Meta	San Luis de Cubarral	Vereda Puerto Ariari	03°47'22,2"	73°50'37,9"	591

7.1.3 Ensayos a libre y a no libre escogencia

Los ensayos a libre y a no libre escogencia se realizaron con el propósito de evaluar la parte fenotípica de este trabajo, estableciendo la preferencia de los artrópodos plaga sobre la yuca (Mesa *et al.*, 1987; Marín, 2015).

7.1.3.1 Ácaro verde (*M. tanajoa*)

El ensayo a libre escogencia se hizo tomando cinco lóbulos de cada genotipo (10 en total), se acomodaron en cajas de Petri (150mm X 15mm) y sobre una espuma humedecida con agua, estos se distribuyeron alrededor en círculo y de forma alternada (Figura 4a). En el centro de cada caja se ubicó un lóbulo infestado con cerca de 20 ácaros (Figura 4b). En este bioensayo se trabajó con 6 cajas de Petri para un total de 30 repeticiones por genotipo (30 lóbulos). Con respecto al ensayo a no libre escogencia, se ubicó el mismo genotipo en una sola caja, es decir, 10 lóbulos del genotipo susceptible (CMC 40) en una y 10 lóbulos del genotipo resistente (Ecu 72) en otra (Figura 4c, d). En este bioensayo se emplearon 6 cajas de Petri para un total de 30 repeticiones por genotipo. La ubicación de los ácaros fue la misma que en el ensayo a libre escogencia. Para los dos tipos de ensayo se contó el número de huevos puestos por la hembra en función de su preferencia dos veces por día durante 5 días.

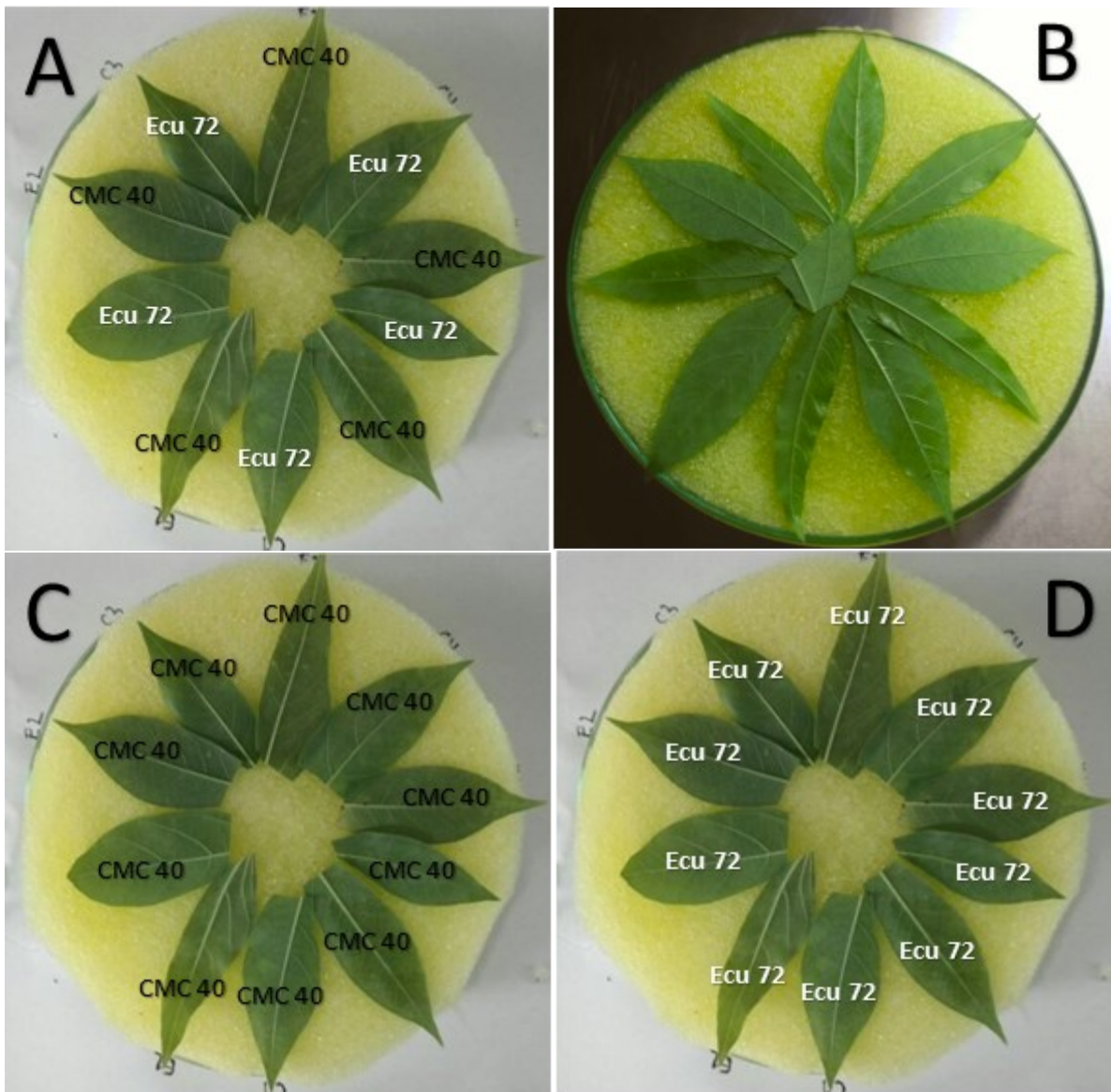


Figura 4. Diseño experimental, bioensayo ácaro verde. A. Ensayo a libre escogencia, B. Parte de un lóbulo infestado con ácaros, C y D. Ensayo a no libre.

7.1.3.2 Mosca blanca (*A. socialis*)

El ensayo a libre escogencia consistió en ubicar en una jaula de 2 metros de largo por 2 de ancho y 1 de alto, cuatro grupos con cuatro plantas cada uno y organizadas de tal manera que en cada grupo hubiesen dos plantas de cada genotipo (CMC 40 y Ecu 72) intercaladas entre sí (Figura 5 a). Posteriormente, se infestó con moscas adultas durante 4 días continuos para su ulterior conteo. Para este bioensayo se tomaron 4 plantas por genotipo para un total de 8, la cantidad de hojas que se contaron constituyeron las réplicas del experimento. En cuanto al ensayo a no libre escogencia, en jaulas de 1m² se ubicaron 4

plantas del mismo genotipo, para un total de 2 jaulas y 8 plantas (Figura 5 b). Como en el ensayo a libre escogencia las réplicas fueron constituidas por las hojas que se contaron.

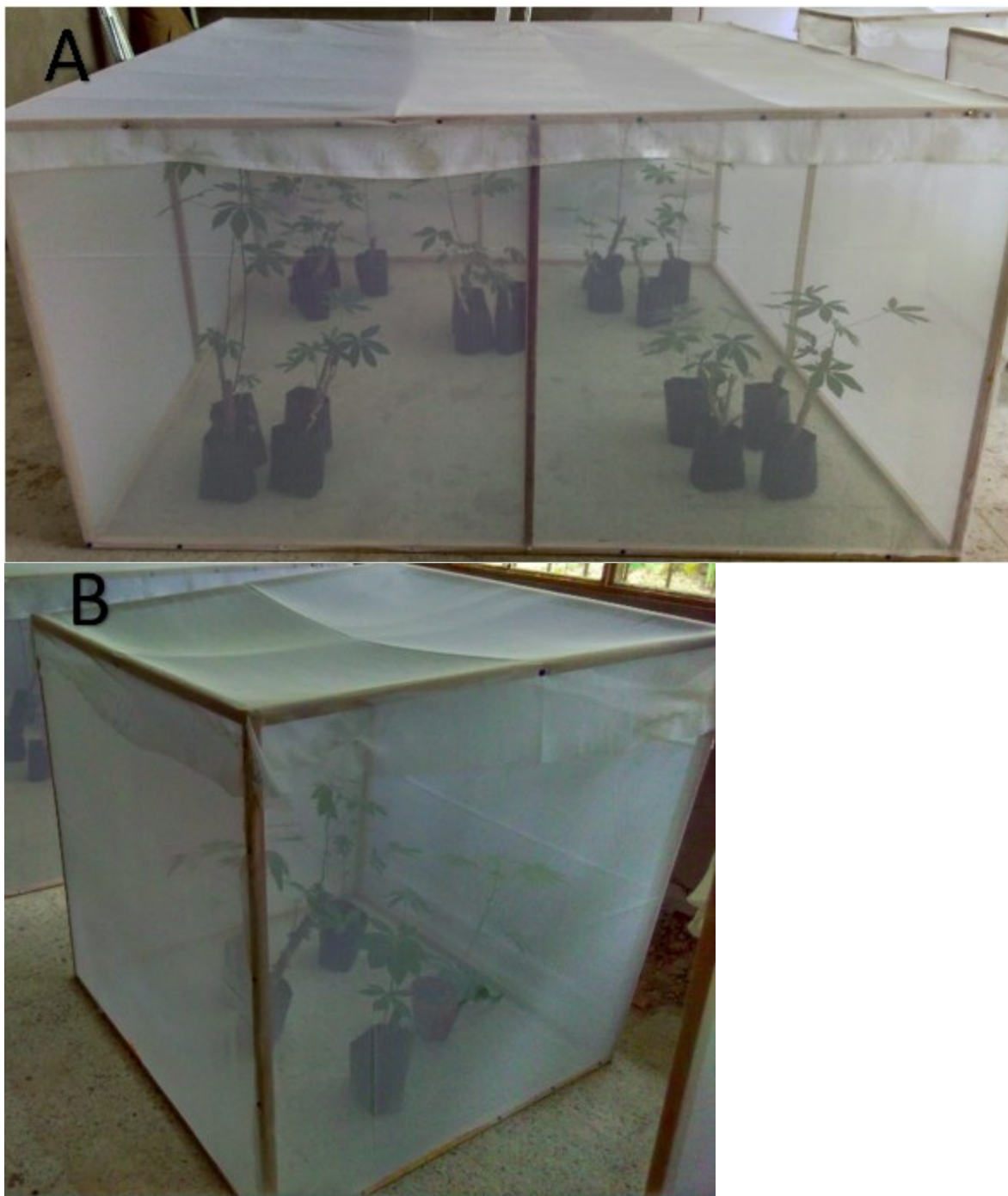


Figura 5. Diseño experimental, bioensayo mosco blanca. A. Ensayo a libre escogencia, B. Ensayo a no libre escogencia.

7.1.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de la oviposición se realizó mediante un gráfico de cajas y bigotes para observar la distribución de los datos. Debido a que los datos no presentaban una distribución homogénea, se decidió hacer una prueba de rangos de Wilcoxon con la ayuda del programa R, el cual compara el rango medio de dos muestras relacionadas y determina si las diferencias entre estas se deben a eventos del azar o no. Con base en lo anterior se trabajó con dos hipótesis:

H0: La variable ovoposición tiene la misma distribución en los dos genotipos (las medianas son iguales).

H1: En una población, la ovoposición tiende a dar valores mayores que en la otra (Las medianas son diferentes).

7.2 Análisis molecular de la interacción planta-artrópodo

7.2.1 Análisis in silico

7.2.1.1 Identificación de genes de referencia y genes relacionados con la vía del ácido jasmónico

Se realizó una búsqueda de genes que estuvieran relacionados con la vía del ácido jasmónico, para eso se utilizó la herramienta “perturbations” del software Genevestigator V3, con la cual se comparan varios experimentos relacionados con el sistema de estudio de interés, artrópodos plaga y *Arabidopsis thaliana*. Con la herramienta RefGenes del mismo software se identificaron nuevos candidatos a genes de referencia. La función de RefGenes es buscar genes que exhiban una variación mínima de expresión en un conjunto de matrices elegido.

7.2.1.2 Diseño de primers y PCR

Los ortólogos en yuca de los genes de *Arabidopsis thaliana* se identificaron gracias a la herramienta BLAST de phytozome (<http://www.phytozome.net/>). Las secuencias de yuca obtenidas se usaron como plantillas para el diseño de primers utilizando el software primer3plus y Primer designing tool de NCBI (Tabla 2). La especificidad de los pares de cebadores fue confirmada por BLASTN con todas las secuencias de *Manihot esculenta* disponibles en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Los primers se analizaron con la ayuda del software NetPrimer (<https://www.premierbiosoft.com/netprimer/>).

Tabla 2. Genes de trabajo y sus secuencias de primers usados para el análisis molecular.

Nombre de gen	Nº accesión	Descripción gen	Secuencia de primers	Amplicón
---------------	-------------	-----------------	----------------------	----------

UBQ10	Manes.07G019300.1	Ubiquitina 10	Fwd TCCACCTTGCATCTCGTTCT	196pb
			Rev TTCCGTCCTCTAGCTGCTTC	
G3PDH	Manes.15G156700.1	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Fwd CACTGTCCACTCCATTACCG	180pb
			Rev CAGCTCTTCCACCTCTCCAG	
CEV1	AT5G05170	Celulosa sintasa	Fwd GGTATGGCTACGGTGAAGA	500pb
			Rev GCAAGGACTTTTCAGCAGACC	
MYC2	AT1G32640	Factor de transcripción MYC2	Fwd CTCTGATCTCGCCGCTCTTT	330pb
			Rev ACCTTCTTTTCGGTGCTCCTG	
LOX2	AT3G45140	Lipoxigenasa 2	Fwd TGCCAACAGAAGAGCCAACA	360pb
			Rev GAACTCCCTTCCCTGTGACC	
AOS	AT5G42650	Aleno oxido sintasa	Fwd AACCCACCATCCACACCTT	313pb
			Rev TCCAGAGAAGCCATCGTGA	
OPR2	AT1G76690	Ácido oxidodionodienoico reductasa	Fwd TGGCCCCTCGACTTAAAGC	745pb
			Rev TCCCCCGTATTCGTCTGTTC	

7.2.1.3 Caracterización estructural de los promotores

7.2.1.3.1 Búsqueda y alineamiento de secuencias

La búsqueda de las secuencias de los genes ortólogos en yuca se obtuvieron a partir de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la plataforma phytozome. Con la ayuda del software MEGA7 v.7.0 y su herramienta Clustal W se obtuvieron los diferentes alineamientos de las secuencias de DNA. Para la elaboración del árbol filogenético se utilizó el método de Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000.

7.2.1.3.2 Búsqueda y caracterización de promotores

La búsqueda de los promotores se realizó con la herramienta JBrowser de Phytozome, tomando las secuencias de aproximadamente 1500pb en sentido 5' del codón de inicio de la transcripción de cada gen. El análisis *in silico* se llevó a cabo utilizando el programa PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantCARE>, Lescot et al. 2002), el cual busca sitios reguladores que actúan en *cis* presentes en una secuencia promotora basado en los datos almacenados en la base de datos. Posteriormente se llevó a cabo la caracterización de la región reguladora.

7.2.2 Análisis de expresión de genes

Para el caso del análisis de la expresión génica se utilizaron las evaluaciones a no libre

escogencia. Se seleccionaron dos tipos de materiales, uno susceptible (CMC 40) y otro resistente (Ecu 72). Se evaluaron cinco tiempos durante la interacción del sistema yuca artrópodos plaga; un tiempo cero (0) donde no hay infestación, a las seis (6) horas donde los artrópodos establecen un primer contacto, a las 24 horas los artrópodos entran en contacto directo con la yuca, cuatro (4) días en donde los artrópodos se establecen e inician la colonia y 8 días en donde la colonia se ha establecido por completo. Se denominó 6 y 24 horas como respuesta temprana y 4 y 8 días como respuesta tardía (Marín, 2015). Los tiempos para la mosca blanca fueron distintos, tiempo inicial de 24 horas, seguido de 48 horas, cinco días y un tiempo final de 8 días. Se realizó una repetición biológica y tres repeticiones técnicas.

7.2.2.1 Extracción DNA y RNA

La extracción de DNA y RNA se realizó mediante 100mg de material vegetal de cada uno de los tiempos evaluados, utilizando el kit Invisorb® Spin Plant Mini Kit y el kit InviTrap Spin Plant RNA Mini Kit, respectivamente, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Se realizó una repetición biológica y tres repeticiones técnicas.

7.2.2.2 Gel de calidad y cuantificación

El gel de calidad del DNA y RNA se hizo al 2% de agarosa, con una corrida de 100 voltios por 40 minutos en una cámara de electroforesis horizontal y una visualización en un transiluminador E-Gel Imager. La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó gracias al espectrofotómetro Cytation 3, Cell Imaging Multi-Mode Reader de BioTek, del laboratorio del grupo biotox de la universidad de los llanos, este equipo cuenta con una placa de 16 pozos, con la capacidad de analizar muestras por duplicado y por consiguiente obtener una cuantificación exacta.

7.2.2.3 Síntesis de cDNA

Previo a la síntesis de cDNA se realizó una digestión de DNA con el kit DNase I en las muestras de RNA, para evitar contaminación y errores en el análisis molecular. Se trabajó con una concentración de 1000ng de RNA, adicionando 1ul de buffer 10x, 1ul de DNase I y completándose a 10ul con agua libre de nucleasas, la mezcla de reacción se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, posterior a eso se agregó 2 ul de EDTA 25 mM y se calentó a 65°C por diez minutos.

La síntesis de cDNA se realizó utilizando el kit ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis. A los 10 ul de reacción producto de la digestión se le agregó 3ul de oligo d(T)23VN (50 µM), se denaturó a 70 °C por 5 minutos y se colocó de inmediato en hielo. 10ul del M-Mulv Reaction mix y 2ul de M-Mulv Enzyme Mix se adicionaron a la reacción, acompañada de una incubación a 42 °C por una hora, inactivación de la enzima a 80°C por 5 minutos y un paso final de dilución de la muestra a 50 ul con 25 ul de agua libre de nucleasas. De los 1000ng iniciales se utilizó 500ng para la síntesis de cDNA.

7.2.2.4 Amplificación de los cinco genes

La PCR se realizó en un termociclador Labnet Multigene Optimax con el siguiente programa de amplificación: desnaturalización a 95 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, con una temperatura de alineamiento variable en función del gen amplificado durante 30 segundos, a 72 °C durante 30 segundos y una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. El producto de amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 2%. Se utilizó un marcador de peso de 100pb y 50pb para indicar el peso de la banda amplificada. Para la estandarización del PCR de los diferentes genes se realizó como primer paso un touchdown con una temperatura de alineamiento variable de +0,4 por cada ciclo (a 25 ciclos) para verificar que los primers estaban bien diseñados y por lo tanto comprobar la especificidad de la amplificación. Una vez comprobada la efectividad de los primers, se realizó una amplificación con un gradiente de temperatura para determinar la temperatura óptima de anillamiento y, por consiguiente, obtener una banda más clara. La cuantificación de las bandas se realizó mediante el software IMAGEJ V. 1.52a (Schneider *et al.*, 2012).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Análisis fenotípico

8.1.1 Oviposición *Mononychellus tanajoa*

8.1.1.1 Bioensayo a no libre escogencia

El gráfico de caja y bigotes muestra que hasta el tercer día el genotipo CMC40 (rojo) presenta los máximos valores. A partir del cuarto día el comportamiento es muy similar entre los dos genotipos. Se observa ausencia de homocedasticidad (Figura 6).

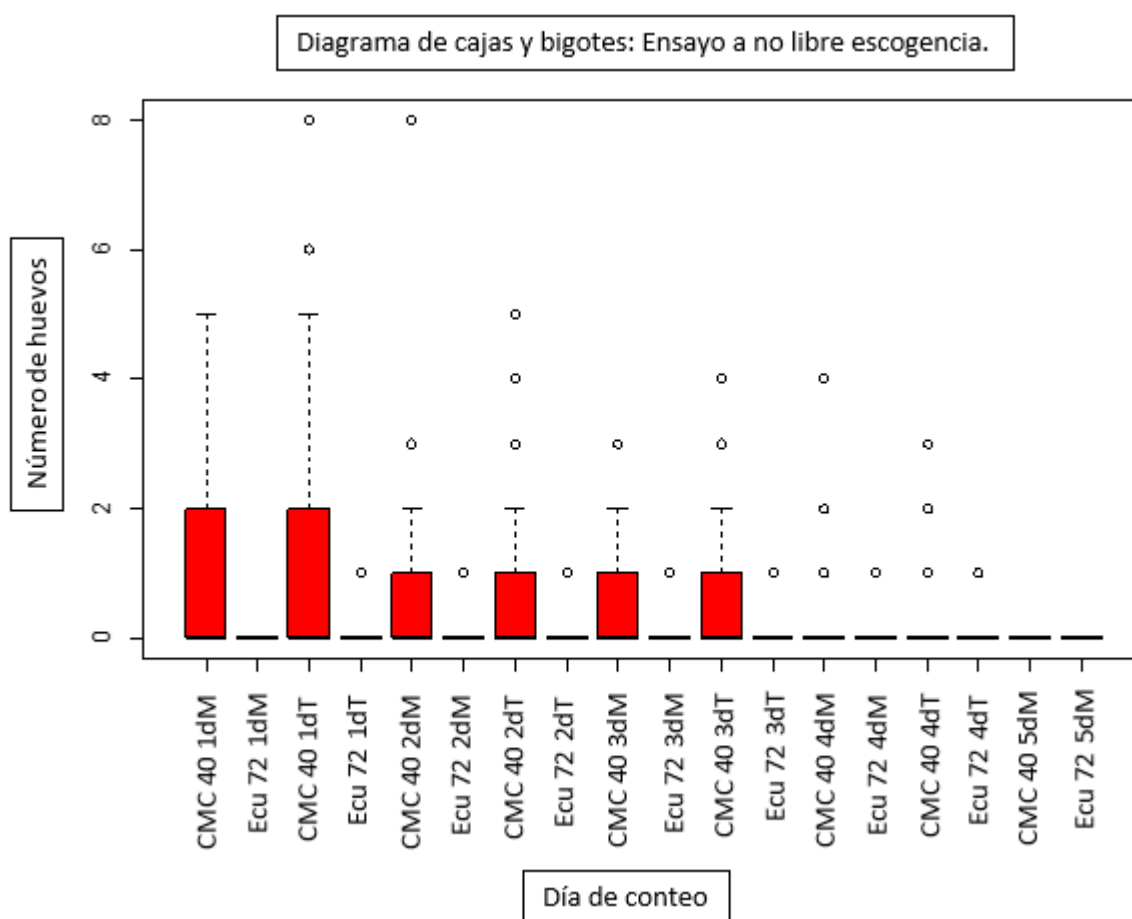


Figura 6. Modelo de cajas y bigotes, número de huevos según genotipo y día, bioensayo a no libre escogencia. 1dM: Día uno en la mañana; 1dT: Día uno en la tarde; 2dM: Día dos en la mañana; 2dT: Día dos en la tarde; 3dM: Día tres en la mañana; 3dT: Día tres en la tarde; 4dM: Día cuatro en la mañana; 4dT: Día cuatro en la tarde; 5dM: Día cinco en la mañana; 5dT: Día cinco en la tarde.

Al realizar un contraste para la comparación de los grupos no fue posible aplicar un análisis de comparación de medias, debido a la falta de homogeneidad de los datos, por ello se decidió aplicar la prueba de rangos de Wilcoxon, en la cual las hipótesis de prueba que se

manejaron son:

H0: La variable ovoposición tiene la misma distribución en los dos genotipos (las medianas son iguales)

H1: En una población, la ovoposición tiende a dar valores mayores que en la otra (Las medianas son diferentes).

Los resultados de la prueba de Wilcoxon arrojó un valor de p menor a $2.245e^{-14}$, al nivel de significancia de 5%, se rechaza la hipótesis nula, por consiguiente se puede decir que la ovoposición es diferente en los genotipos evaluados.

Las curvas de ovoposición (Figura 7) presentan patrones bastante diferenciados en los genotipos. En el caso del genotipo ECU72 la ovoposición día a día es casi nula. En el genotipo CM40 el segundo tiempo es el de máxima ovoposición, descende en el tercero, con un leve repunte en el cuarto tiempo, para luego descender casi a cero en el noveno tiempo. Se observa en todo momento que el genotipo CM40 presenta valores más altos de ovoposición. Para apoyar estos resultados se plantearon varios modelos mixtos.

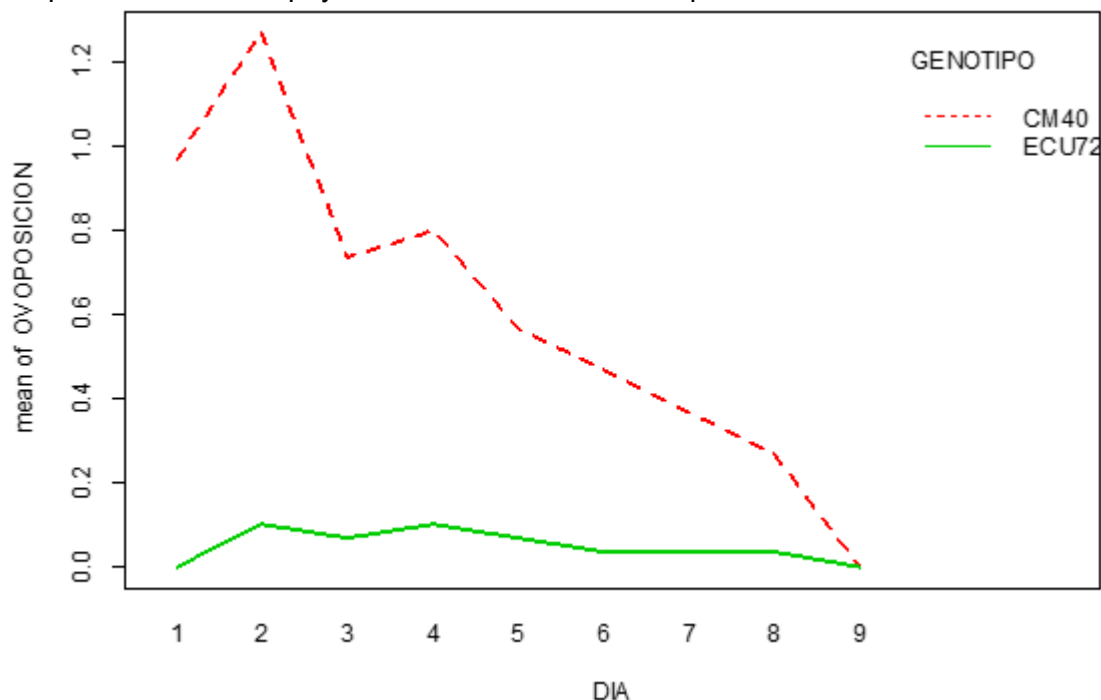


Figura 7. Curva de ovoposición de los dos genotipos CMC 40 y Ecu 72, bioensayo a no libre escogencia.

En la figura 8 se pueden observar los resultados del mejor modelo encontrado en función polinómica del tiempo en potencia dos con un coeficiente de -0.02723 . En cuanto al genotipo, con el genotipo CM40 como referencia, se puede observar que el genotipo ECU72 (coeficiente= -2.52881) presenta menor ovoposición a través del tiempo, entre 2 y 3 huevos menos en promedio. Con base en lo anterior podría sugerirse que el genotipo CMC 40 es menos viable como cultivo por su baja resitencia a la ovoposición del ácaro verde que el genotipo Ecu 72.

```

Formula: OVOPOSICION ~ 1 + I(DIA^2) + GENOTIPO + (1 | IND)
Data: datos

      AIC      BIC   logLik deviance df.resid
  513.4    530.6   -252.7    505.4     536

Scaled residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.387 -0.319 -0.168 -0.071  8.903

Random effects:
Groups Name      Variance Std.Dev.
IND      (Intercept) 2.46    1.57
Number of obs: 540, groups: IND, 30

Fixed effects:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  -0.89721    0.35633   -2.52    0.012 *
I(DIA^2)      -0.02723    0.00394   -6.90  5.1e-12 ***
GENOTIPOECU72 -2.52881    0.28819   -8.77 < 2e-16 ***

```

Figura 8. Resultados del mejor modelo encontrado (en función polinómica del tiempo en potencia dos), bioensayo a no libre escogencia.

En el diagrama de cajas (figura 6) se puede ver como el límite inferior, el primer cuartil y la mediana coinciden, igualmente, la gráfica muestra que la distribución de datos no es simétrica, sino que presentan una asimetría hacia la derecha, es decir, que al menos el 50% de los datos tienen valores de cero, posiblemente esto pase por el número de réplicas y de conteo tan bajos. En la curva de oviposición (figura 7) se puede apreciar una clara diferencia en el promedio de oviposición entre los dos genotipos, siendo el CMC 40 el preferido por los ácaros, mientras que Ecu 72 apenas hubo presencia de huevos. Los resultados obtenidos muestran lo que en teoría se esperaba, un alto porcentaje de oviposición en el genotipo susceptible (CMC 40) y uno bajo en el resistente (Ecu 72) lo que podría sugerir la alta susceptibilidad y baja herencia genética de elementos relacionados con la defensa de la planta para el caso de CMC 40 y todo lo contrario para Ecu 72. Aunque solo se determinó la preferencia de oviposición de los ácaros, estudios posteriores en donde se evalúen tanto la preferencia de oviposición como para la alimentación ayudará a identificar posibles y potenciales genotipos resistentes a esta y muchas otras más plagas (Strucker *et al*, 2017). Walangululu *et al.*, (1998) dentro de los resultados de su trabajo de mecanismos de resistencia al ácaro verde en variedades de yuca pubescentes y no pubescentes encontraron que la preferencia de oviposición fue influenciada por la temperatura. Siete de las seis variedades trabajadas tuvieron el mayor número de huevos a una temperatura de 27°C, lo que podría sugerir que la temperatura con la que se trabajó en la evaluación de preferencia de oviposición fue la óptima. Marin (2015), encontró que en los ensayos a no libre escogencia en donde se comparaban 5 distintos genotipos (incluido el genotipo Ecu 72) con el genotipo susceptible CMC 40, el genotipo 60444 (susceptible) presentó alta oviposición (13,34 huevos/hembra/2 días) y el genotipo NAT31 (resistente) baja oviposición (4,4 huevos/hembra/2 días), con respecto a CMC 40 (7,98 huevos/hembra/2 días) y a Ecu 72 (7,3 huevos/hembra/2 días), la diferencia es baja y posiblemente sea diferente a los resultados del presente trabajo por el tamaño de la muestra.

8.1.1.2 Bioensayo a libre escogencia

El gráfico de caja y bigotes (Figura 9) muestra que en general el genotipo CMC40 (verde) presenta los máximos valores en cada día. Al igual que en el bioensayo a no libre escogencia, se observa ausencia de homocedasticidad. Igualmente, no es posible realizar un contraste para la comparación de medias por la falta de homogeneidad de los datos y por lo tanto se aplica nuevamente la prueba de rangos de Wilcoxon con las mismas hipótesis planteadas en el bioensayo a no libre escogencia. Los resultados de la prueba arrojaron un valor de p menor a $8,172e^{-08}$ al nivel de significancia de 5%, rechazando la hipótesis nula y por tanto se puede asumir que la ovoposición es diferente en los genotipos evaluados.

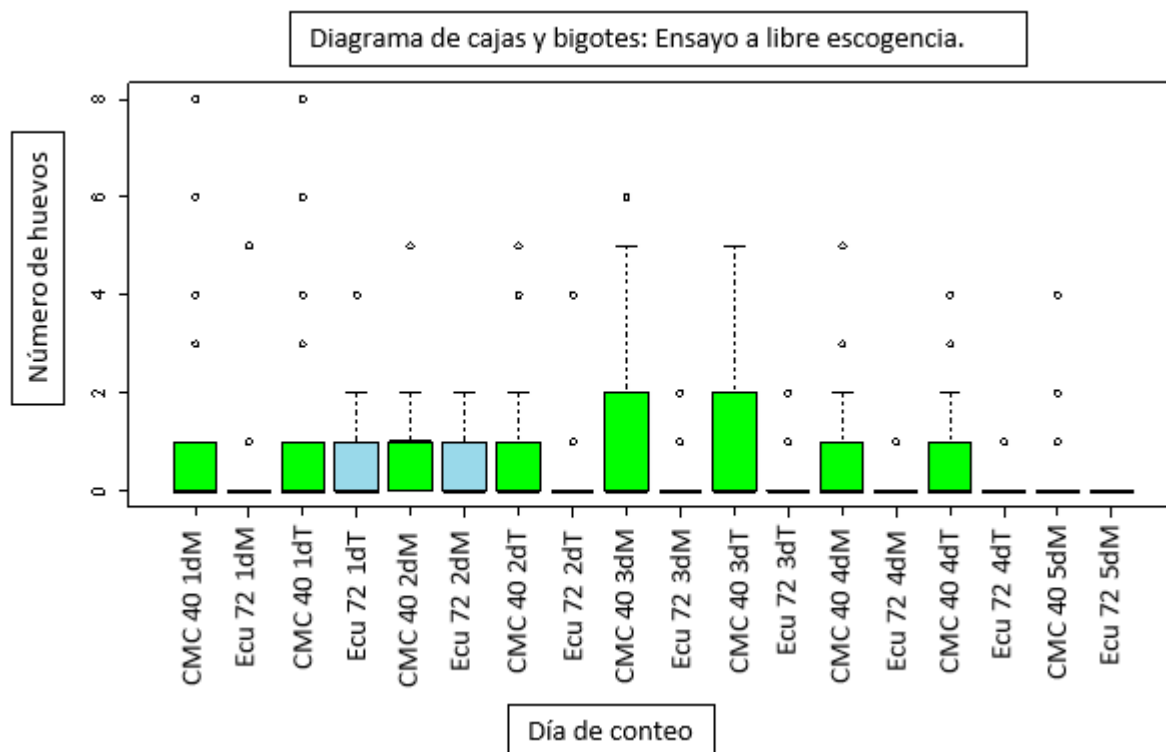


Figura 9. Modelo de cajas y bigotes, número de huevos según genotipo y día, bioensayo a libre escogencia. 1dM: Día uno en la mañana; 1dT: Día uno en la tarde; 2dM: Día dos en la mañana; 2dT: Día dos en la tarde; 3dM: Día tres en la mañana; 3dT: Día tres en la tarde; 4dM: Día cuatro en la mañana; 4dT: Día cuatro en la tarde; 5dM: Día cinco en la mañana; 5dT: Día cinco en la tarde.

Las curvas de oviposición (Figura 10) presentan patrones similares en los genotipos, sin embargo, el promedio de huevos puesto en el periodo de observación siempre es superior en el genotipo CM40. Para apoyar estos resultados gráficos se plantearon varios modelos mixtos. A continuación, se muestran los resultados del mejor modelo encontrado (en función polinómica del tiempo en potencia dos). Todas las variables son significativas. En cuanto al genotipo, con el genotipo CM40 como referencia, se puede observar que el genotipo ECU72 (coeficiente=-1.0651) presenta menor ovoposición a través del tiempo (Figura 11).

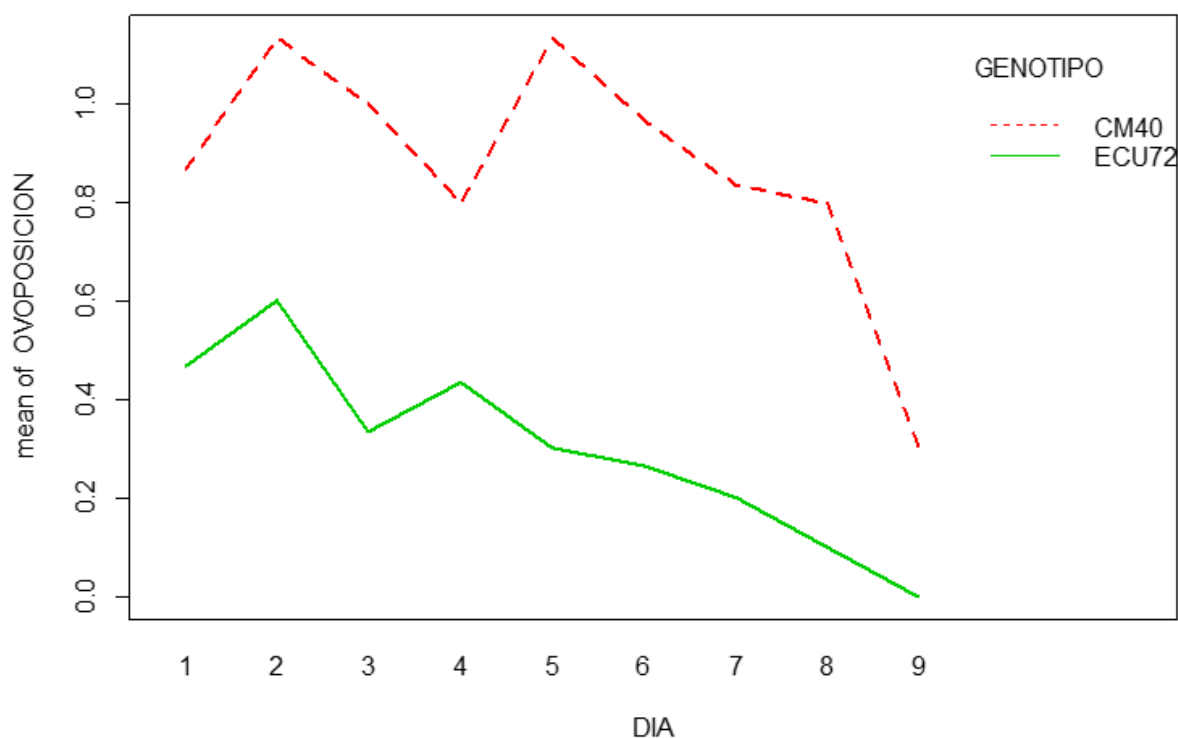


Figura 10. Curva de oviposición de los dos genotipos CMC 40 y Ecu 72, bioensayo a libre escogencia.

```

Formula: OVOPOSICION ~ 1 + DIA + I(DIA^2) + GENOTIPO + (1 | IND)
Data: datos

      AIC      BIC   logLik deviance df.resid
      918      940     -454      908       535

Scaled residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.563 -0.502 -0.265 -0.094  5.322

Random effects:
Groups Name      Variance Std.Dev.
IND      (Intercept) 2.44      1.56
Number of obs: 540, groups: IND, 30

Fixed effects:
              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)   -1.0565    0.3727   -2.83   0.0046 **
DIA            0.1946    0.0989    1.97   0.0491 *
I(DIA^2)      -0.0318    0.0103   -3.10   0.0020 **
GENOTIPOECU72 -1.0651    0.1266   -8.42  <2e-16 ***

```

Figura 11. Resultados del mejor modelo encontrado (en función polinómica del tiempo en potencia dos), bioensayo a libre escogencia.

El modelo de cajas y bigotes del bioensayo a libre escogencia (figura 9) muestra lo mismo que sucede con el bioensayo a no libre escogencia, el límite inferior, el primer cuartil y la mediana coinciden. Hay una asimetría hacia la derecha lo que quiere decir que al menos el 50% de los datos tienen valores de cero. Marín (2015) encontró que en los ensayos a libre escogencia el material 60444 (susceptible) fue en el que el ácaro ovopositó más (9,9

huevos/hembra/2 días) y el más bajo sobre el material NAT31 (resistente) (0,42 huevos/hembra/2 días). En general los resultados obtenidos muestran que *M. tanajoa* tiene alta preferencia por el genotipo CMC 40, tanto en el bioensayo a libre escogencia como a no libre escogencia, material que ha sido utilizado bastante tiempo como control frente a diversas evaluaciones de estreses. La preferencia por CMC 40 puede estar dada por agentes físicos y químicos; dentro de los físicos estarían las barreras preformadas o constitutivas que influyen en la adaptación del ácaro a yuca, en cuanto a agentes químicos, están los metabolitos secundarios que actúan sobre la repelencia o atracción (Schoonhoven et al., 2005; Dicke & Baldwin, 2010; Piesik et al., 2011).

Ahora bien, en los dos bioensayos, Ecu 72 fue identificado como el menos preferido en términos de preferencia de oviposición del ácaro verde. La oviposición es la manera por medio de la cual los insectos o artrópodos pueden asegurar su descendencia y por lo tanto su especie, y de esta forma colonizar ecosistemas completos (Marin 2015). Con base en lo anterior el genotipo Ecu 72 al ser el menos preferido por el ácaro verde puede evitar que este colonice un ecosistema al controlar su infestación y por consiguiente sea un cultivar de gran importancia y utilidad en regiones con alta presencia de este artrópodo, como lo es, Asia, Africa, America central, America del Sur y especialmente Colombia y Venezuela al ser los países mejor representados por este ácaro (Vásquez y Parsa, 2014).

Un trabajo realizado por el CIAT en el 2006 que buscaba evaluar germoplasma de yuca para encontrar genotipos resistentes al ácaro verde, cruzaron Ecu 72, que a menudo mostraba una baja a moderada resistencia al ácaro verde, con Col 2246, una variedad susceptible a la mosca blanca. De 700 genotipos evaluados, solo 10 tenían índices bajos de daño. Estos 10 genotipos se evaluaron en el laboratorio en ensayos de oviposición. CMC 40 se utilizó como control susceptible. Los resultados mostraron una alta oviposición en CMC 40 y baja en los demás genotipos. Estos resultados coinciden con los encontrados en el presente trabajo, con la particularidad de que en este no fue necesario cruzar el genotipo Ecu 72 con otra variedad, lo que podría indicar que Ecu 72 es un cultivar resistente al ácaro verde y por lo tanto considerable para el cultivo.

8.2 Análisis molecular

8.2.1 Analisis *in silico*

8.2.1.1 Genes de referencia y genes relacionados con la vía del ácido jasmónico

Genevestigator es un buscador de alto rendimiento que integra miles de experimentos de microarreglos y RNAseq que son de libre acceso y cuidadosamente seleccionados y bien organizados, visualizando muy bien la expresión génica en diversos contextos biológicos como tejidos, enfermedades, nutrientes, productos químicos o genotipos. La búsqueda de genes relacionados con la vía del ácido jasmonico (AJ) se realizó mediante la herramienta “perturbaciones”, y como datos de entrada se usaron experimentos realizados en *A. thaliana* con ataques de *Bemisia tabaci*, *Liriomyza huidobrensis* y *Myzus persicae* (Figura

12). En ninguno de los 21 experimentos analizados se encontraron genes relacionados con AJ que, o se sobreexpresaran, o se reprimieran. Aun así, se encontraron dos genes relacionados con la vía del etileno (*PORA* y *ERF6*), con la defensa de la planta (*CYS4*) y más específicamente en la actividad inhibidora de la endopeptidasa de tipo cisteína e involucrado en la regulación de procesos endógenos y defensa contra plagas y patógenos (Bohorquez, 2011). Igualmente, se halló el gen *CBL1* relacionado con la vía del ácido abscísico (ABA). Posterior a esto se realizó la búsqueda de genes de referencia.

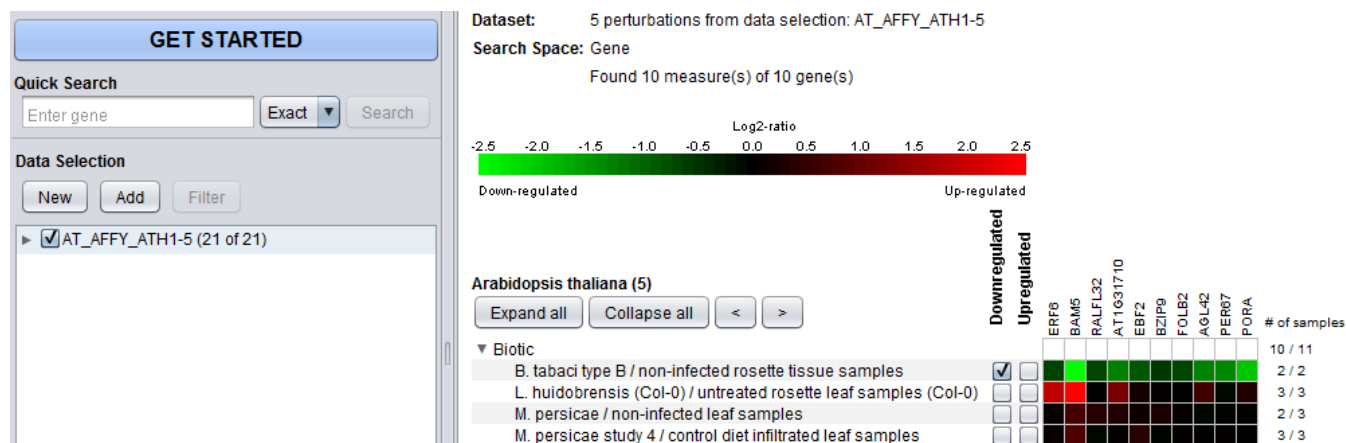


Figura 12. Experimentos evaluados para la búsqueda de genes relacionados con la vía del ácido jasmonico.

Con base en los 21 experimentos obtenidos según la herramienta “perturbaciones” se realizó la búsqueda de genes de referencia sin genes blanco, es decir con los valores predeterminados (Hruz *et al.*, 2011). La herramienta RefGenes arrojó los mejores 20 candidatos a genes de referencia (figura 13). Luego se realizó la búsqueda teniendo los 5 genes diana (*LOX2*, *MYC2*, *OPR2*, *CEV1* y *AOS*). Se obtuvieron resultados distintos, siendo el gen *AT4G26410* el mejor candidato (Figura 14).

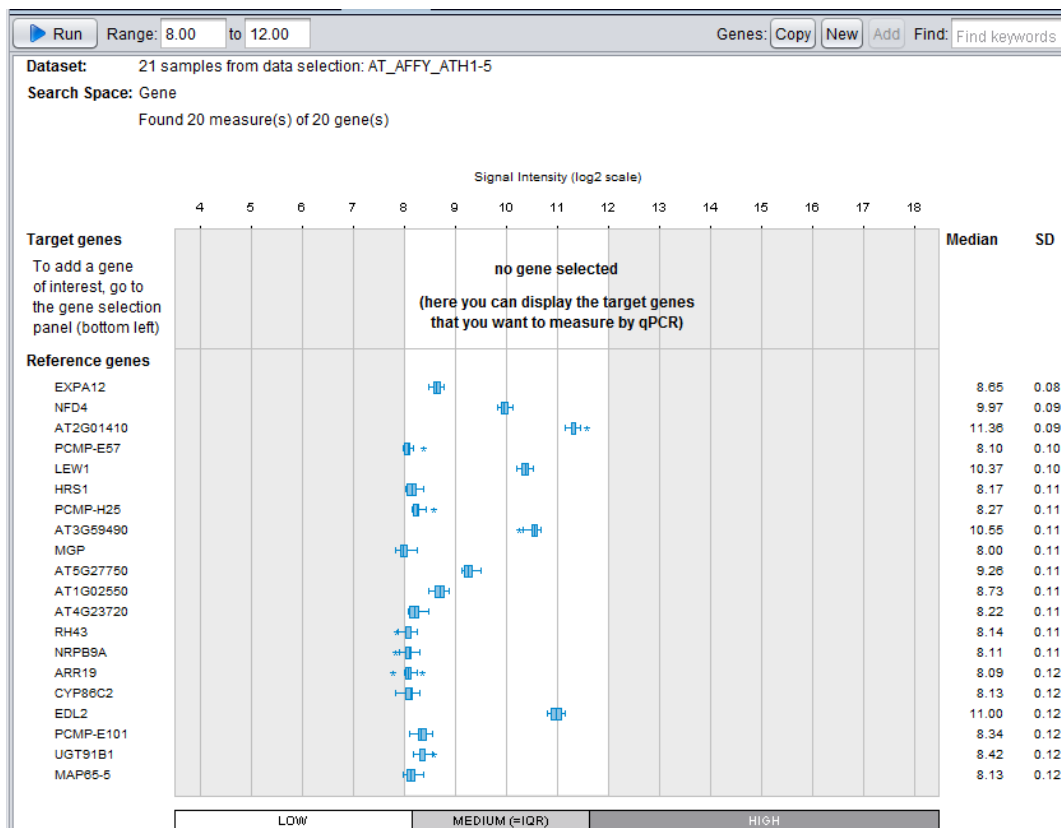


Figura 13. Candidatos a genes de referencia sin genes diana.

Por otro lado *UBQ10* es un gen que se usa comúnmente como gen de referencia, sin embargo, análisis de grandes conjuntos de datos de expresión génica han sugerido que este está regulado bajo condiciones experimentales específicas y por lo tanto no es adecuado para la normalización de los datos en RT-qPCR (Jian *et al.*, 2008, Expósito-Rodríguez *et al.*, 2008, Brand y Hovav, 2010, Garg *et al.*, 2010). Aun así, el trabajo realizado por Moreno *et al.*, (2011) establece que *UBQ10* presenta un patrón de expresión muy estable en diferentes tejidos infectados con el virus de yuca (CBSV del inglés, *cassava Brown streak virus*) y variedades de yuca. Por esta razón se realizó nuevamente la búsqueda con este gen incluido en los genes diana para ver su expresión según las condiciones seleccionadas (Figura 15). Se encontró que efectivamente podría ser un buen candidato a gen de referencia.

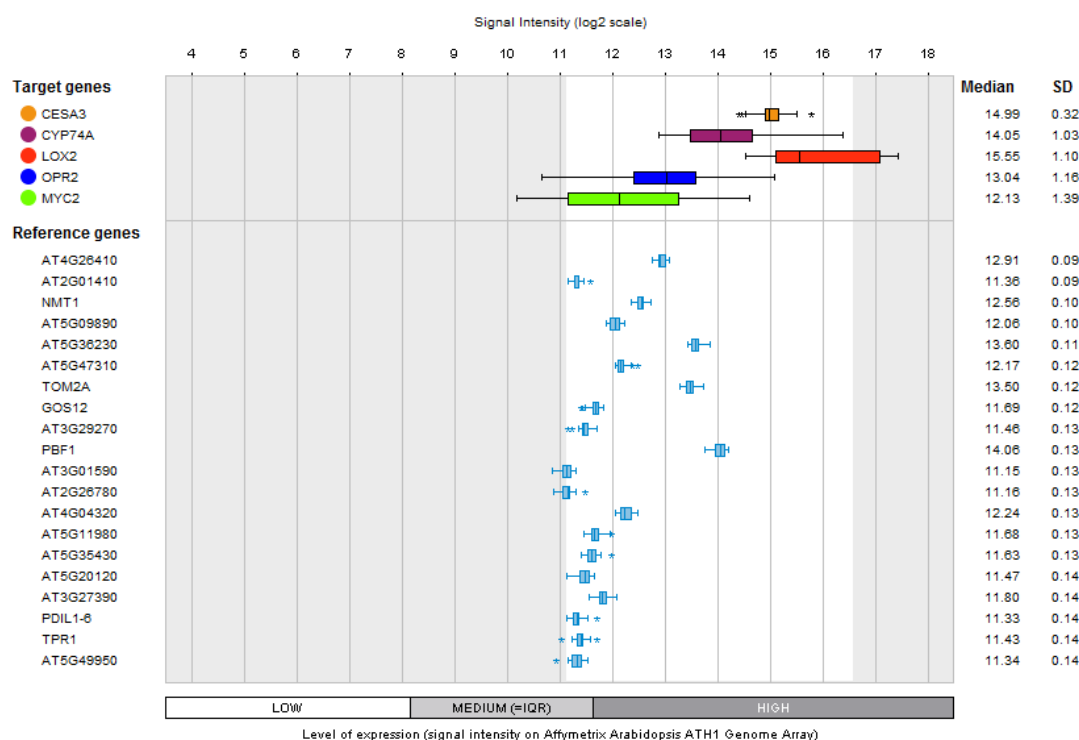


Figura 14. Candidatos a genes de referencia con los 5 genes diana.

Para una cuantificación fiable de los transcritos es necesario una normalización adecuada de los datos ya que la calidad e integridad del RNA, como la eficiencia de la transcriptasa inversa y etapas del PCR pueden ser diferentes entre las muestras (Vandesompele et al., 2002; Hruz et al., 2008). Se han realizado varias estrategias para escoger y validar genes de referencia, entre estas está las etiquetas de secuencias expresadas (EST del inglés, *expressed sequence tag*), datos de transcriptoma y de Genechip de genoma completo. Asimismo, varias especies de plantas han servido como modelos para la búsqueda de estos genes de referencia, como es el caso de *Arabidopsis*, tomate y cebada (Coker y Davies, 2003; Exposito-Rodriguez et al., 2008; Faccioli et al., 2007). Pocos estudios se han hecho en yuca, pero dentro de ellos se encuentran el ya mencionado por Moreno et al., (2011), en la búsqueda de genes de referencia para una cuantificación fiable de potyvirus y el análisis de la carga del virus del rayado marrón de la yuca en variedades hospedadoras; así como, el trabajo realizado por Hu et al., (2016) donde se logró identificar nuevos genes candidatos de referencia que podían ser utilizados para normalizar los datos de los niveles de expresión génica en diversas fases de desarrollo y bajo estrés por sequía, esto lo realizaron por medio de los programas geNorm (Vandesompele et al., 2002) y NormFinder (Andersen et al., 2004).

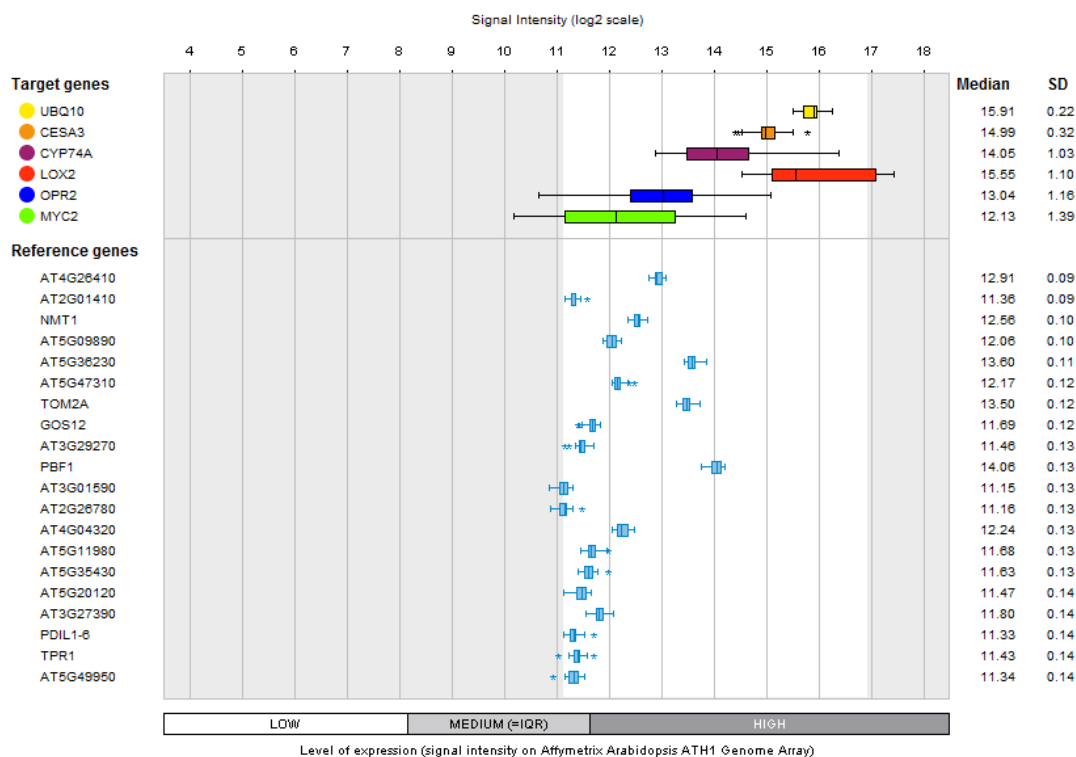


Figura 15. Análisis del gen UBQ10 como candidato a gen de referencia.

8.2.1.2 Caracterización estructural de los promotores

Se realizó la caracterización estructural de los promotores de los genes AOS, CEV1, LOX2, MYC2 Y OPR2, asociados a la vía de señalización del ácido jasmónico. Con base en secuencias iniciales de *Arabidopsis thaliana* se identificaron los posibles genes ortólogos en yuca. Para el análisis se tomaron las primeras cinco secuencias por ser las más cercanas a las secuencias de entrada. Posterior al BLAST, se realizó un alineamiento con el programa MEGA7 con el fin de encontrar el gen ortólogo de la secuencia de *A. thaliana*. Esto se llevó a cabo mediante las secuencias de proteínas de cada una de los genes encontrados. El alineamiento Clustal W arrojó que las secuencias que se encuentran en el cromosoma 5, 10, 15, 18, y 7 de yuca son las más similares a la secuencia de los genes AOS, CEV1, MYC2, OPR2 y LOX2, respectivamente, de *A. thaliana* (Figura 16).

Una vez realizado el alineamiento y el árbol filogenético de las secuencias encontradas en yuca, se utilizó el programa PlantCARE para obtener motivos reguladores que actúan en *cis* presentes en la región promotora de las secuencias seleccionadas. La búsqueda de motivos *cis* se realizó primero para la secuencia promotora de *A. thaliana* para posteriormente compararlos con los obtenidos en la yuca.

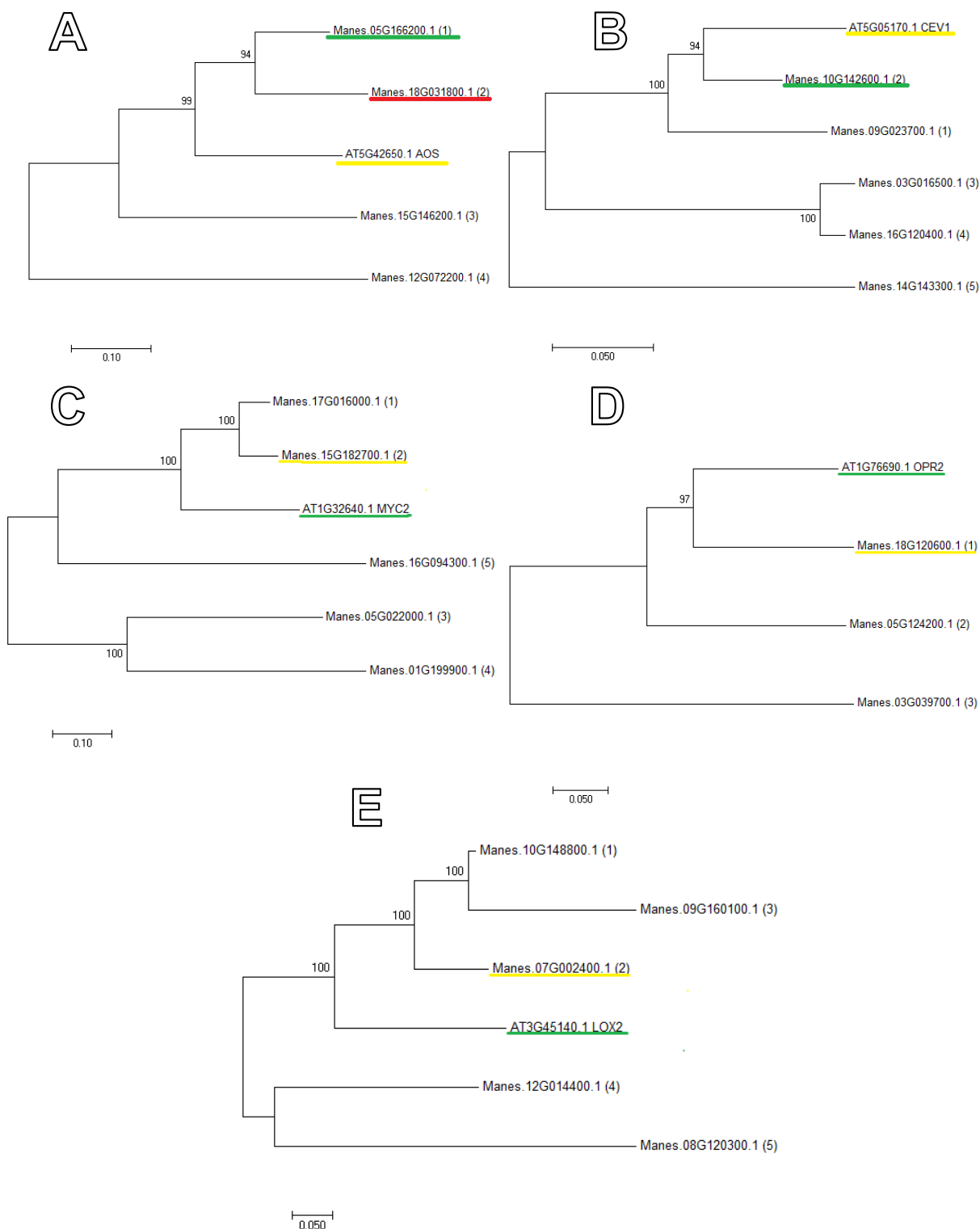


Figura 16. Arboles filogenéticos de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta*. A. Arbol filogenético del gen AOS, B. Arbol filogenético del gen CEV1, C. Arbol filogenético del gen MYC2, D. Arbol filogenético del gen OPR2, E. Arbol filogenético del gen LOX2.

Una vez realizado el alineamiento y el árbol filogenético de las secuencias encontradas en yuca, se utilizó el programa PlantCARE para obtener motivos reguladores que actúan en *cis* presentes en la regiones promotoras. La búsqueda de motivos *cis* se realizó primero para la secuencia promotora de *A. thaliana* para posteriormente compararlos con los obtenidos en la yuca.

El análisis de los promotores se llevó a cabo para identificar y caracterizar los diferentes elementos *cis* que se encuentran en los genes asociados a la vía del ácido jasmónico. Estos motivos *cis* se presentan en la tabla 3. Se encontraron en todas regiones evaluadas un total de 38 motivos, a continuación se discutiirán algunos de los más importantes, especialmente aquellos relacionados con la defensa de la planta.

Tabla 3. Elementos *cis* encontrandos en los genes asociados a la vía del ácido jasmonico.

Motivo	AOS	Ortólogo AOS	CEV1	Ortólogo CEV1	MYC2	Ortólogo MYC2	OPR2	Ortólogo OPR2	LOX2	Ortólogo LOX2
3-AF1 binding site									✓	
5UTR Py-rich stretch		✓	✓	✓	✓	✓			✓	
ABRE	✓			✓	✓				✓	
ACE		✓		✓	✓	✓	✓		✓	
ARE	✓		✓	✓	✓		✓		✓	✓
AT-rich element						✓	✓		✓	✓
Box 4	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓
Box-W1					✓		✓	✓	✓	
CAAT-box	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CAT-box	✓		✓						✓	✓
CGTCA-motif	✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓	
G-Box	✓			✓			✓		✓	
LTR			✓						✓	✓
MBS	✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓
GARE-motif	✓		✓		✓		✓		✓	
O2-site									✓	
Skn-1_motif	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
TC-rich repeats		✓	✓	✓	✓				✓	✓
TCA-element	✓	✓							✓	✓
TGACG-motif	✓	✓	✓		✓			✓	✓	
circadian	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	
AACA_motif	✓									
Box CCGTCC	✓									
ERE	✓									
HSE	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓		
MSA-like	✓									

P-box			✓							
WUN-motif							✓			
MBSI		✓						✓		
AE-box			✓		✓					
ATCC-motif			✓							
CCAAT-box			✓				✓			
as-2-box			✓							
ATCT-motif				✓						✓
TA-rich region				✓	✓					
TGA-element					✓		✓			
GCN4_motif							✓			
AT1-motif								✓		

Con base en los resultados obtenidos, los motivos *cis* encontrados en los promotores pueden agruparse en cinco principales clases: Elementos básicos de transcripción, elementos sensibles a la luz, motivos sensibles a fitohormonas, elementos sensibles a la defensa y estrés y elementos sensibles a heridas y patógenos (Tabla 4). La clase “motivos sensibles a fitohormonas” fue la que más elementos *cis* agrupó, por tal motivo parte de la discusión se centró alrededor de estas secuencias reguladoras.

Tabla 4. Clasificación de los motivos *cis* encontrados en los genes asociados a la vía del ácido jasmonico.

Clase	Elementos <i>cis</i>
Elementos básicos de transcripción	5UTR Py-rich stretch, AT-rich element, CAAT-box TA-rich region.
Elementos sensibles a la luz	3-AF1 binding site, ACE, Box 4, G-Box, AE-box.
Elementos sensibles a fitohormonas	ABRE, CGTCA-motif, GARE-motif, TCA-element, TGACG-motif, ERE GARE, P-box, TGA-element.
Elementos sensibles a la defensa y estrés	LTR, MBS, TC-rich repeats, HSE.
Elementos sensibles a heridas y patógenos	Box-W1, WUN-motif.

Cuando se habla de la respuesta de una planta frente a cualquier estímulo ya sea exógeno o endógeno, se debe tener claro que esta no es la consecuencia de una sola ruta de señalización hormonal sino una compleja unión e interacción entre rutas de señalización. Ya que distintos estímulos provocan que esta compleja red de interacciones se realice, el resultado final de estas será la que determine las respuestas específicas al daño inicial.

Un ejemplo claro de lo mencionado anteriormente es la respuesta de las plantas a patógenos y heridas, en los dos casos la vía del ácido jasmónico y la del etileno se activan, pero es la combinación de estas dos rutas la que genera una respuesta específica para cada estímulo (Lozano y Lorenzo, 2004). Por eso, Lozano y Lorenzo (2004) consideran que la investigación de los mecanismos moleculares de la señalización hormonal en plantas se ha enfocado en dos aspectos, uno, en lo mencionado anteriormente, la interacción entre

las distintas vías de señalización, y dos, cómo la regulación de la estabilidad de las proteínas por medio de la ubiquitinación (degradación de proteínas) tiene un papel importante en el control de la señalización hormonal en las plantas. Con base en lo expuesto anteriormente, no es raro haber encontrado motivos *cis* que están involucrados o son sensibles al etileno (ET), ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA), auxinas y giberelinas (GA) ya que se ha descrito un gran número de interacciones entre los JAs y estas rutas de señalización hormonal (Turner *et al.*, 2002; Rojo *et al.*, 2003; Wasternack y Hause, 2013; Qi *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014; Kazal, 2015).

En el caso del etileno, solo se encontró un motivo relacionado, ERE, ubicado en la región promotora del gen AOS de *A. thaliana*. Se ha encontrado que las respuestas de las plantas al etileno están vinculadas a alteraciones drásticas en la expresión génica y se ha identificado que los motivos ERE encontrados en las regiones promotoras se unen al factor sensible del etileno (ERF) generando sensibilidad a este; este elemento *cis* se ha hallado en la secuencia promotora de genes inducidos o estimulados con ET (Itzhaki *et al.*, 1994). La ausencia de este motivo *cis* en los demás genes podría sugerir que actúan o tienen una expresión independiente de la presencia del etileno y/o de su vía de señalización. En cambio, la presencia del motivo ERE y su unión al ERF en el gen AOS de *Arabidopsis*, podría confirmar lo dicho por Lorenzo *et al.*, (2003), donde ARF además de participar en la señalización del ET, también es un elemento clave en la respuesta a JA, precisamente en *Arabidopsis*, al jugar un papel importante en la unificación de ambas señales para la posterior activación de los mecanismos de defensa. Igualmente, lo dicho anteriormente concuerda con los motivos involucrados en la respuesta de un jasmonato (MeJA) que se encontraron en el mismo gen (AOS), los motivos CGTCA y TGACG.

En cuanto al ácido abscísico, se encontró el motivo ABRE, unos elementos *cis* involucrados en la capacidad de respuesta a este ácido. Se encontró en los genes de *Arabidopsis*, AOS, MYC2 y LOX2, y en el ortólogo en yuca del gen CEV1 (Tabla 3); con una frecuencia de 4, 4, 2 y 2 respectivamente (datos no mostrados). Estudios realizados por Skriver *et al.*, (1991) demostraron que varias copias del motivo ABRE le confieren la capacidad de respuesta a ABA a un promotor, en cambio la presencia de una sola copia del motivo no es suficiente para responder al ABA. Igualmente, este motivo se ha encontrado en trigo y en el gen rd29B de *Arabidopsis* cuya expresión se induce por tratamientos de deshidratación, alta salinidad, baja temperatura y ABA. El motivo DRE (no encontrado) y ABRE son interdependientes y, por lo tanto, para que el gen rd29B responda al ABA es necesario que estos dos motivos se encuentren en el mismo promotor (Narusaka *et al.*, 2003). Con base en lo anterior si los genes AOS, MYC2, LOX2 y el ortólogo de CEV1 tienen un comportamiento similar al gen rd29B, podría esperarse que los genes no se activen frente a la presencia de ABA, pero si su dinámica génica es distinta, podría sugerirse que con solo la presencia del motivo ABRE es suficiente para la expresión de los genes. Un posterior análisis del comportamiento de estos genes frente a tratamientos con ABA podrían responder a la pregunta de si es necesario la presencia del motivo DRE para que estos genes sean sensibles al ABA.

Además, el ácido jasmónico (AJ) tiene la capacidad de inhibir la germinación en varias especies y acompañado del ABA tiene un efecto sinérgico en este proceso en *Arabidopsis*

(Wilén *et al.*, 1991; Ellis y Turner, 2002). Tres de los cuatro genes con copias del motivo *cis* ABRE en sus respectivas regiones reguladoras, presentan dos motivos involucrados con un derivado del AJ, el metil-jasmonico (MeJA) el cual está asociado a la comunicación intracelular y entre diferentes plantas. Teniendo claro lo anterior podría sugerirse que los motivos ABRE (sensible al ABA), motivo CGTCA y motivo TGACG (sensibles al MeJA) suprimen o inhiben al motivo Skn-1, elemento requerido para la expresión del endospermo, y así los genes se expresarán con la intención de inhabilitar la germinación. De ser cierto lo expuesto anteriormente, la aptitud y supervivencia de la yuca estaría fuertemente amenazada ya que la germinación es clave en el desarrollo de estos dos aspectos (Linkies *et al.*, 2012). Por eso mismo es importante comprender la regulación hormonal que subyace a este proceso, desde un interés académico y económico (rendimiento de cultivos).

Los trabajos de Staswick *et al.*, (1992) con mutantes de *Arabidopsis* con sensibilidad disminuida al MeJA demostraron que la inducción de proteínas que actuaban en la inhibición del crecimiento de la raíz, por este derivado del AJ era 4 veces menor en comparación con el tipo salvaje, a su vez encontraron que las semillas de las plantas mutantes eran más sensibles a la inhibición de la germinación por ABA que las silvestres. Lo que quiere decir que no necesariamente tiene que haber un efecto sinérgico entre el JA y el ABA para inhibir la germinación, esto podría pasar en el gen ortólogo del gen CEV1, donde se encuentra el motivo ABRE pero no los motivos sensibles al MeJA, igualmente podría ocurrir la inhibición del motivo Skn-1 como en el escenario sugerido anteriormente.

Ahora bien, Maruyama *et al.*, (2011) identificando elementos *cis* relacionados con el frío y la deshidratación en *Arabidopsis*, arroz y soja, encontraron que el motivo ABRE fue el más conservado en promotores inducibles por deshidratación de las tres especies, lo que sugiere que la regulación de genes inducidos por deshidratación entre estas especies es muy similar. Lo descrito anteriormente no sucede en el presente trabajo (hablando específicamente entre genes y no especies) solo 4 de 10 genes evaluados presentan el motivo ABRE lo que sugiere que este no es indispensable y/o hay otros motivos que cumplen esta función dentro de la yuca como el elemento MBS.

En relación a la vía del ácido salicílico (AS) se encontraron varias copias y motivos que responden a esta hormona. El gen AOS de *Arabidopsis* y su ortólogo en yuca, el ortólogo en yuca del gen CEV1, el gen LOX2 de *Arabidopsis* y su ortólogo en yuca. El motivo encontrado en los mencionados genes es el elemento TCA que interviene en la respuesta al AS. En las interacciones entre AS y AJ las respuestas de defensa frente a alguna infección de un patógeno, puede ser a nivel antagónico o cooperativo.

Entre los ejemplos de interacciones antagónicas se encuentran la inhibición de la síntesis y activación de genes de respuesta al AJ por parte del AS en tomate y patata (Doares *et al.*, 1995; Harms *et al.*, 1998; Niki *et al.*, 1998; O'donnell *et al.*, 1996). Esta interacción antagónica está mediada por el gen NPR1, que actúa como regulador central de la señalización de SA (Spoel *et al.*, 2003). Igualmente, el factor de transcripción WRKY70 regula las interacciones antagónicas entre estas vías, y lo hace de la siguiente manera, la sobreexpresión de WRKY70 activa la expresión constitutiva de los genes PR (proteínas relacionadas con la patogénesis) sensibles a SA y por lo tanto aumenta la resistencia a

patógenos dóciles al SA, y a su vez disminuye la resistencia a patógenos sensibles a JA. Pero cuando se inhibe el factor de transcripción WRKY70 los genes que responden a JA aumentan su expresión y por consiguiente la resistencia a patógenos sensibles a esta hormona aumenta (Li et al., 2004; Shim et al., 2013). Podría decirse que dependiendo del tipo de patógeno que ataque a la planta así mismo será la expresión génica. También, esto tentativamente podría ayudar a combatir plagas específicas que sean sensibles a las PR activadas ya sea por JA o SA.

Se sabe también que en los genes AOS de *Arabidopsis* y su ortólogo en yuca, y LOX2 de *Arabidopsis*, tienen además del motivo TCA, los motivos relacionados con el AJ, podría sugerirse que el factor de transcripción WRKY70 actúa en los motivos TCE de estos genes cuando el patógeno es sensible al AS. En el caso de los genes que no tienen copias del motivo TCE pero sí de los motivos TGACG y CGTCA (*Arabidopsis* CEV1, *Arabidopsis* MYC2, *Arabidopsis* OPR2 y su ortólogo en yuca) (tabla 3), podría esperarse que estos genes no estén controlados por el factor de transcripción WRKY70 y por supuesto sean sensibles solamente al AJ. Un análisis con qPCR podría demostrar lo sugerido anteriormente. Se cuantificaría la expresión de los genes involucrados en dos experimentos, uno con la infección de un patógeno sensible al AJ y otro sensible al AS y con el factor de transcripción WRKY70 sobre expresado y suprimido para ver su comportamiento.

Al mismo tiempo pasa algo particular con la frecuencia en el ortólogo del gen AOS del elemento TCE (datos no mostrados), con 10 copias en la región reguladora, cinco veces más que en los otros genes, lo que podría indicar la gran importancia que tiene este gen en las respuestas de defensa inducidas por la presencia del AS. La suposición anterior podría estar argumentada según los resultados encontrados por Leon et al., (2010) en su trabajo, donde se demuestra que en *Arabidopsis* regula negativamente la expresión de genes importantes en la sensibilidad a JA como PDF1.2 y VSP1, así mismos genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis del JA, como LOX2 Y AOS. Irónicamente se encontraron solo una (LOX2 *Arabidopsis* y ortólogo) y dos (AOS *Arabidopsis*) copias del motivo sensible al AS, mientras que en el ortólogo del gen AOS en yuca diez, lo que podría sugerir que el gen AOS en yuca por motivos de adaptación o evolución se modificó para ser más sensible al AS y por consiguiente evitar la acción del AJ. Entre las interacciones cooperativas entre AS y AJ se encuentran los estudios realizados en *Arabidopsis* y su resistencia a *P. cucumerina* (Berrocal et al., 2002), *P. syringae* y *Peronospora parasitica* (Clarke et al., 2000). Existen varios ejemplos de esta interacción positiva en la defensa de las plantas, pero aún se desconoce los componentes implicados y cómo es la dinámica de la interacción de los mismos (Lorenzo y Solano, 2005).

Con respecto a la auxina, se encontró el elemento de acción en *cis* TGA sensible a la auxina en solo dos genes de *Arabidopsis*, MYC2 y OPR2. Lo quiere decir que estos dos genes ante la presencia de auxina podrían expresarse (Sghaier et al., 2018). Una manera de confirmar la relación entre la secuencia promotora de los genes respectivos y la auxina, sería la construcción de una serie de delecciones del extremo 5' diseñadas de tal forma que contengan o no el elemento *cis* en cuestión, estos se transforman en hojas de *Arabidopsis*

(en yuca que es la planta modelo del presente trabajo, no se encontró el motivo ATG) y el transgénico obtenido se incubaba en medio Murashige-Skoog (MS) con o sin indole-3-acetic acid (IAA), todo esto con la ayuda de un gen reportero, GUS podría ser. Si en los transformantes que presentan en su secuencia el motivo ATG la actividad de GUS en el tejido de la hoja es mayor que en los transformantes que no presentan en su secuencia el elemento *cis* ATG, quiere decir que efectivamente el motivo es sensible a la auxina, conduce a la expresión del gen y por lo tanto es funcional (Xin *et al.*, 2016). De hecho, este procedimiento podría aplicarse para todos los genes y motivos *cis* de interés.

Las giberelinas (GA) son hormonas que entre los diversos aspectos que controlan de la planta están: el crecimiento, desarrollo de la planta, germinación, elongación de tallos, expansión de hojas, desarrollo de flores y semillas, entre otros. La regulación de estos aspectos es realizada por las proteínas DELLA (Espinoza *et al.*, 2012). En la interacción de GA y AJ, las proteínas DELLA compiten con MYC2 (factor de transcripción) para unirse a JAZ (represor de los jasmonatos). Sin la presencia de GA, las proteínas DELLA se unen a JAZ, quedando libre el factor de transcripción MYC2 para llevar a cabo la señalización del AJ. Si GA está presente, permite la degradación de las proteínas DELLA y por lo tanto MYC2 quedará unido a JAZ y la señalización del AJ no se realizará (Hou *et al.*, 2010). Todos los genes de *Arabidopsis* tienen el motivo GARE, el cual es sensible a la giberelina, pasa todo lo contrario con los ortólogos en yuca. Con base en lo expuesto anteriormente se podría sugerir que en yuca estos genes no presentan una regulación negativa por parte de GA y por lo tanto esta tarea o no ocurre (poco probable) o bien es realizada por otra fitohormona.

Cabe destacar que Hou *et al.*, (2010) también observaron que las proteínas DELLA potencian la unión de MYC2 a los motivos G-box en sus genes diana. Los genes de *Arabidopsis* AOS, OPR2, LOX2 y el ortólogo de CEV1 presentan en sus regiones promotoras el motivo G-box, lo que quiere decir que cualesquiera de estos genes pueden estar regulados por el factor de transcripción MYC2. Por otro lado, el AS, AJ y GA están también relacionadas, las proteínas DELLA para ser más exactos. Estas proteínas potencian la señalización de la vía del AJ y confieren por lo tanto un alto nivel de resistencia frente a necrótrofos (hongos) pero hacen que las plantas sean más vulnerables a biotrofos al suprimir al AS. Siguiendo con la idea de que las proteínas DELLA potencian la vía del AJ para la resistencia a hongos, se encontraron elementos *cis* como Box-W1 que son sensibles a inductores fúngicos. Se podría sugerir que las proteínas DELLA potencian la unión de MYC2 a los motivos G-box de los genes OPR2 y LOX2 para que se expresen ante un ataque, pero estos genes en particular se sobreexpresarían frente al ataque de un hongo por tener el motivo Box-W1 en su secuencia promotora.

Con respecto a las otras clases de elementos *cis* (Tabla 4), los elementos básicos de transcripción son por lo general regiones conservadas que cumplen una función de regulación en la expresión génica y sirven como sitios de reconocimiento y unión de factores de transcripción (Pérez y López, 2013). Además, se sabe que la caja CAAT es un motivo *cis* común en promotores con actividad potenciadora que podría ayudar a la expresión elevada de los promotores (Song *et al.*, 2018), como los analizados en este trabajo, ya que

la frecuencia de estos motivos en las regiones reguladoras es la más alta entre todos los elementos *cis* hallados (datos no mostrados). Igualmente, la caja CAAT es el único motivo que está presente en todas las secuencias analizadas, lo que indica su importancia y el papel de los genes en la dinámica de la expresión genica de la yuca.

Siguiendo con los elementos sensibles a la luz, estudios previos han determinado que la luz es un factor ambiental que juega un papel fundamental en el crecimiento de la planta y formación de productos vegetales, incluyendo el desarrollo de metabolitos primarios y secundarios. (Dewdney et al., 1993; Korth et al., 2000; Lopez-Ochoa et al., 2007) Por eso la importancia de los motivos *cis* encontrados y que están relacionados con la luz (Box 4, G-box, ACE, AE-box, 3-AF1 binding site) para que regulen la actividad de transcripción controlada por la luz.

En cuanto a las dos ultimas clases, se encontraron motivos *cis* relacionados al estrés por bajas (LTR) y altas temperaturas (HSE), sequía (MBS), defensa general de la planta (TC-rich repeats), sensibilidad a inductores fúngicos (Box-W1) y a heridas (WUN-motif), funciones mostradas en la base de datos PlantCare (<http://intra.psb.ugent.be:8080/PlantCARE>) (Lescot et al., 2002). Estos datos proporcionan evidencia de que los genes evaluados (excepto el ortólogo MYC2) probablemente participan en las respuestas a factores bióticos y abióticos. Como es el caso del gen AOS y OPR2 que presenta el motivo WUN en sus regiones reguladoras, lo que indica que sus proteínas son sensibles a la herida y se verán moduladas en gran medida por estas.

Tomando en conjunto los resultados obtenidos en este análisis *in silico* podría decirse que no se encuentran mayores diferencias entre los genes de *Arabidopsis* y los ortólogos de estos en yuca y que todos están relacionados fuertemente a estreses bióticos/abióticos y en general a la defensa de la planta, a excepción del ortólogo de MYC2 el cual presenta el número más reducido de motivos *cis* y ninguno involucrado en la respuesta a AJ, AS, AG, ET y auxinas, lo que sugiere que en yuca su función no es primordial en la defensa de la planta frente a estreses bióticos y abióticos. También se observa una integración de la señalización de las diferentes hormonas (AJ, AS, AG, ET y auxinas) y su importancia en la regulación de la expresión de genes involucrados con la defensa de la planta.

Del mismo modo la predicción de un gran número de secuencias promotoras y su contribución ha crecido últimamente debido al auge de las tecnologías transcriptómicas y la secuenciación de genomas completos de plantas (como la yuca). No obstante, la demostración de la función del elemento *cis* dentro de la actividad promotora permitirá confirmar las secuencias reguladoras, ya que las secuencias reguladoras predichas pueden ser funcionales o no.

Ahora bien, con temor a equivocarme y siendo solo una suposición, podría sugerirse que la diferencia entre las plantas resistentes y susceptibles estaría determinada en función de la presencia y/o ausencia de ciertos motivos *cis* esenciales y relacionados con la defensa, estrés, metabolismo, entre otros aspectos, de la yuca. Por eso la necesidad de hacer PCR, qPCR y secuenciación de las secuencias promotoras analizadas para comprobar su presencia y diferencias.

8.2.2 Análisis de expresión de genes

El presente estudio evaluó cualitativamente la expresión de 5 genes relacionados con la vía del ácido jasmonico en dos cultivares de yuca, uno resistente (ECU-72) y otro susceptible (CMC 40) al ataque de artrópodos plaga (ácaro verde y mosca blanca).

Para el análisis molecular de la interacción planta-artrópodo se realizó inicialmente un touchdown (TD) de 55 °C a 65 °C (temperatura de alineamiento) con el propósito de determinar que efectivamente los primers fueron bien diseñados y amplificaban la región diana (Tabla 2). Los primers del gen LOX2 y MYC2 no amplificaron en el rango de temperatura de alineamiento mencionado anteriormente, por tal motivo se realizó dos nuevos touchdowns, uno de 59°C a 63,6°C y otro de 65°C a 60,4°C (Figura 17). Se observa que los primers amplifican exitosamente la región diana en los dos TD.

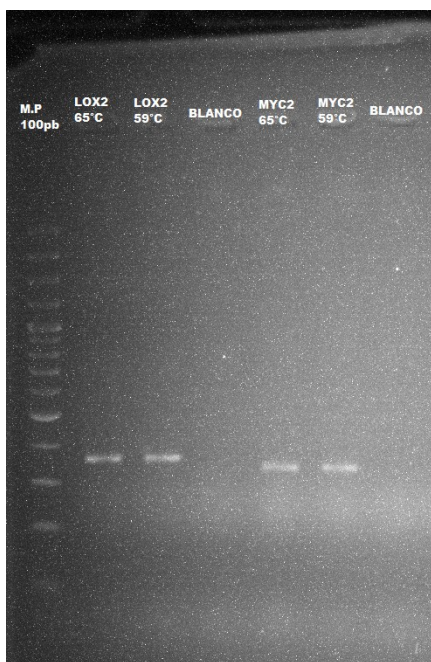


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 2% del Touchdown de los genes LOX2 y MYC2 para determinar la efectividad de los primers.

Posterior al TD se realizó un pequeño gradiente de tres temperaturas por primer para establecer la temperatura óptima de alineamiento (Figura 18). Se observa que para el gen AOS y *CEV1* la banda de la temperatura 57,8 es la más nítida, por consiguiente, para estos dos genes se escogió 58°C como temperatura de ideal. Para el gen *LOX2* se tomó 60°C como temperatura óptima de alineamiento aunque no presentaba diferencias muy marcadas con las otras posibles temperaturas. En el caso del gen MYC2, fue necesario realizar un nuevo gradiente, para este se utilizaron 5 temperaturas, siendo la banda de 60°C la más intensa y por lo tanto se trabajó con esta temperatura el resto de amplificaciones (Figura 19). Con respecto al gen G3PDH se realizó un gradiente con 7 temperaturas, de las cuales 61°C se tomó como la óptima (Figura 20). Los genes ubiquitina 10 (UBQ10) y OPR2 de un gradiente de 5 temperaturas, 61°C y 58°C fueron las temperaturas de alineamiento seleccionadas, respectivamente (Figura 21). Cabe mencionar que la decisión de tomar la

temperatura ideal de cada primer se realizó con base en las bandas obtenidas y en las temperaturas sugeridas por primer3plus al momento de diseñar los cebadores e igualmente con el análisis realizado por el software NetPrimer.

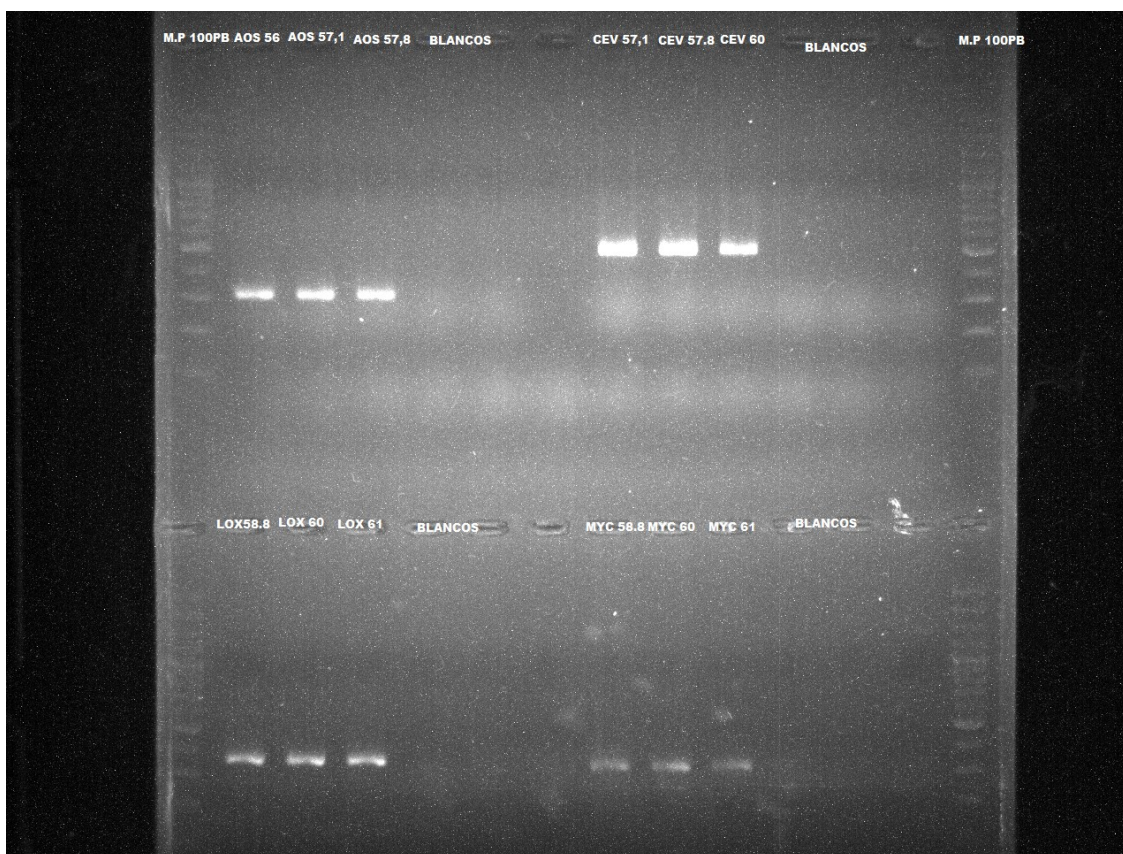


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gradiente de temperatura de los primers AOS, CEV1, LOX2 y MYC2.

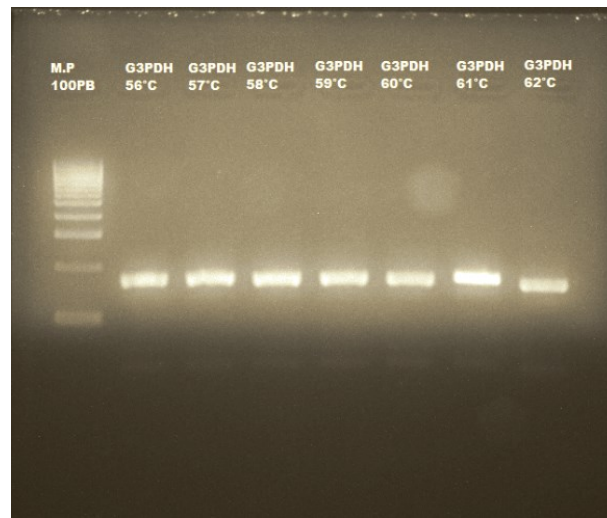


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gradiente de temperatura del primer MYC2.

Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gradiente de temperatura del primer G3PDH.

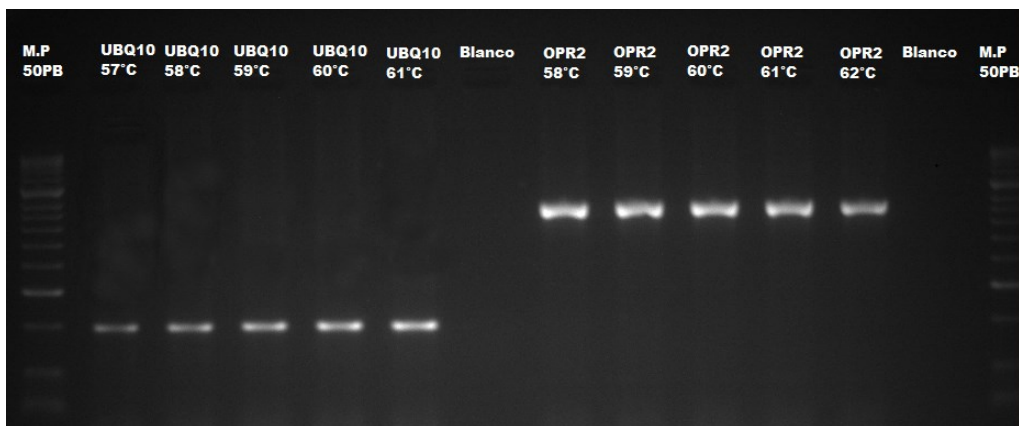


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gradiente de temperatura del primer UBQ10 y OPR2.

Obtenida las condiciones necesarias para que los primers se unan eficientemente a la secuencia diana y por lo tanto haya una amplificación deseada se realizó el análisis molecular de las interacciones planta-artrópodo.

8.2.2.1 Interacción entre *Mononychellus tanajoa* y *Manihot esculenta* Crantz

Como se mencionó anteriormente para el análisis molecular de la interacción entre el ácaro verde (*M. tanajoa*) y la yuca (*M. esculenta*) se manejaron 5 tiempos. Un tiempo cero donde no hay infestación, a las seis horas donde los artrópodos establecen un primer contacto, a las 24 horas los artrópodos entran en contacto directo con la yuca, 4 días en donde los artrópodos se establecen e inician la colonia y 8 días en donde la colonia se ha establecido por completo. Y con estos tiempos, 5 genes (LOX2, CEV1, MYC2, AOS y OPR2) involucrados en la vía del ácido jasmónico (AJ) más dos como genes de referencia (G3PDH, UBQ10).

Las imágenes de los geles de agarosa al 2% de los genes evaluados en la interacción ácaro verde – yuca, y de aquellos utilizados como posibles genes de referencia, se encuentran entre las figuras 22 y 28.

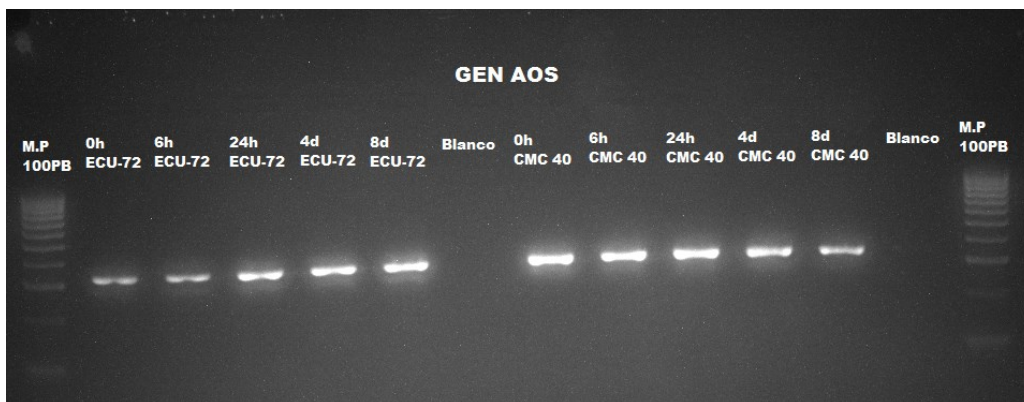


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen AOS. 0h: Cero horas; 6h: Seis horas; 24h: Veinticuatro horas; 4d: Cuatro días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.

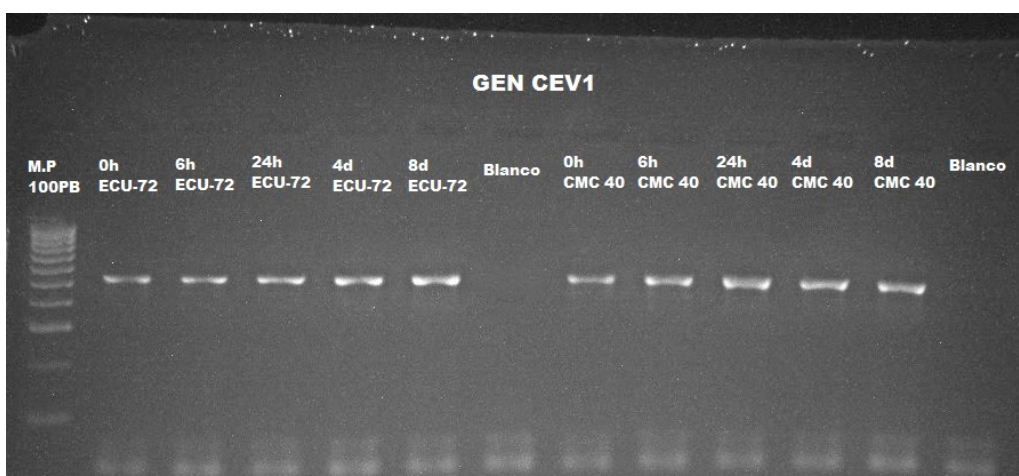


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen CEV1. 0h: Cero horas; 6h: Seis horas; 24h: Veinticuatro horas; 4d: Cuatro días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.

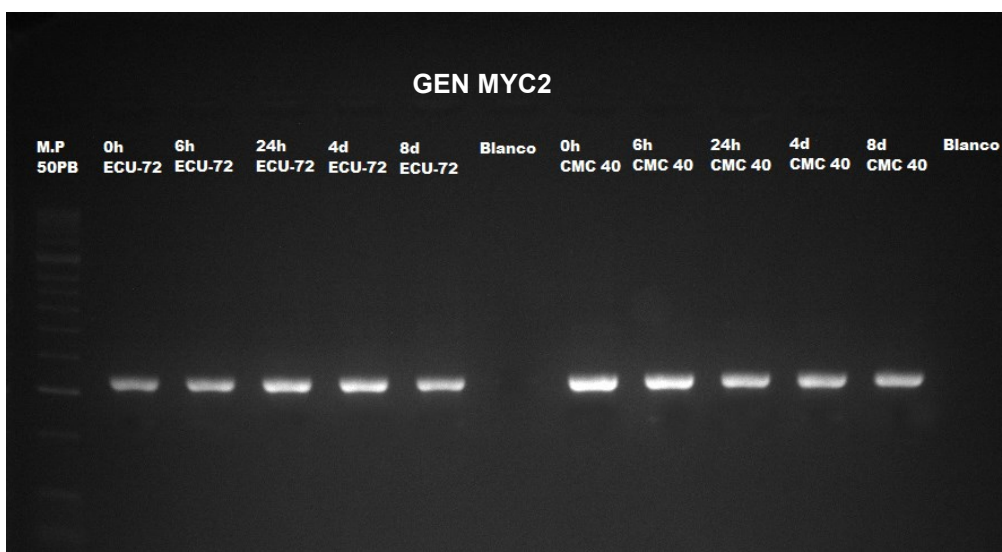


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen MYC2. 0h: Cero horas; 6h: Seis horas; 24h:

Veinticuatro horas; 4d: Cuatro días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.

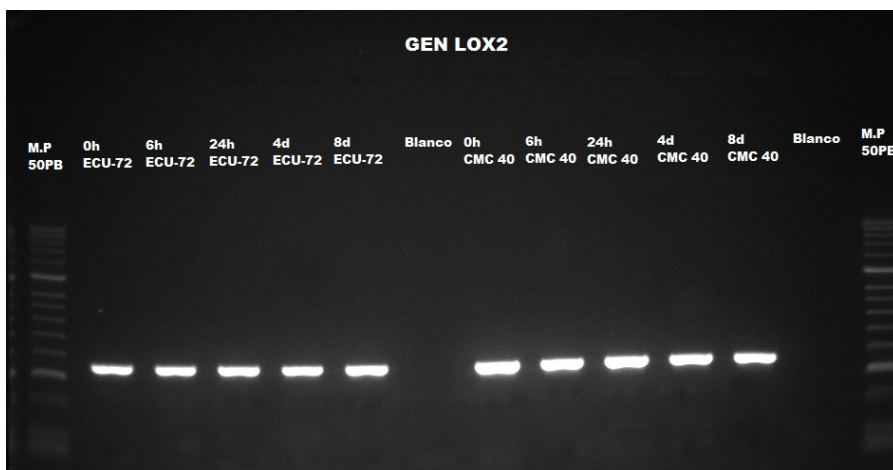


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen LOX2. 0h: Cero horas; 6h: Seis horas; 24h: Veinticuatro horas; 4d: Cuatro días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.

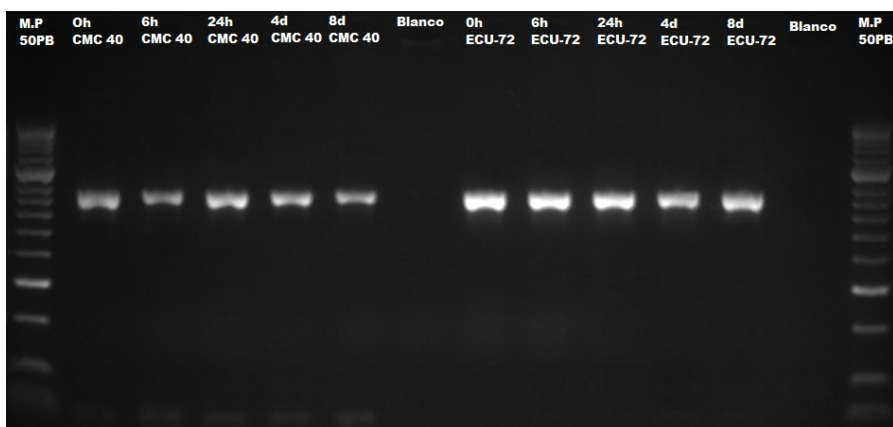


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen OPR2. 0h: Cero horas; 6h: Seis horas; 24h: Veinticuatro horas; 4d: Cuatro días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.

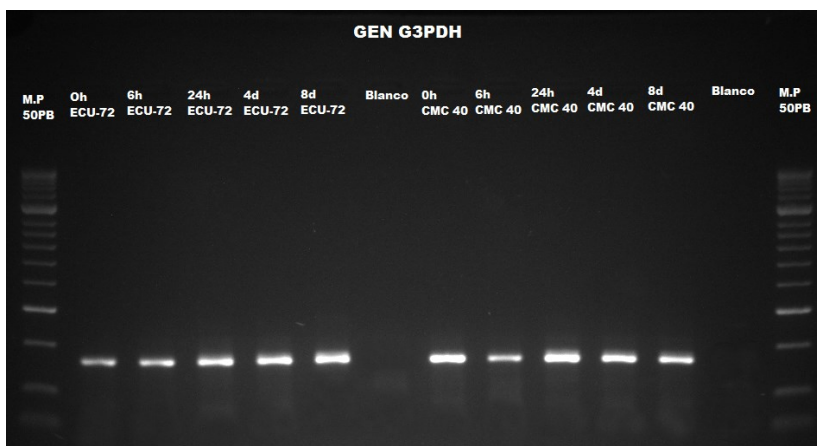


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen G3PDH. 0h: Cero horas; 6h: Seis horas;

24h: Veinticuatro horas; 4d: Cuatro días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.

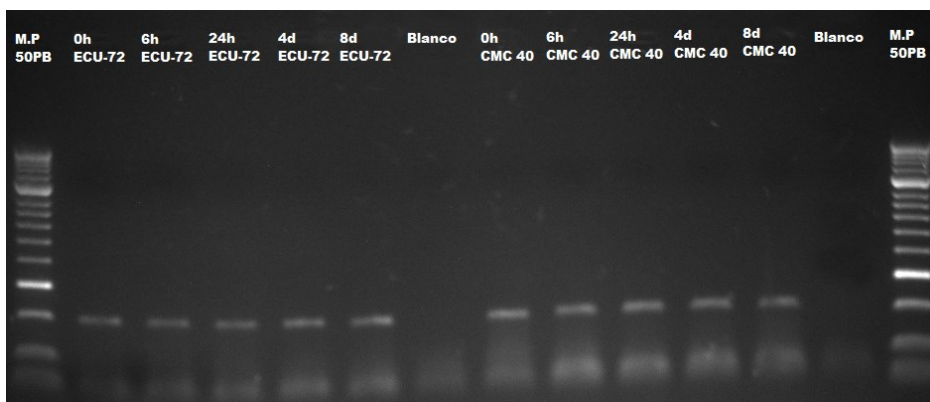


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen UBQ10. 0h: Cero horas; 6h: Seis horas; 24h: Veinticuatro horas; 4d: Cuatro días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.

El análisis semi cuantitativo de los resultados observados en los geles de agarosa (Figuras 22–28), se realizó con ayuda del software ImageJ al realizar un análisis densitométrico de las bandas obtenidas. Los análisis se llevaron a cabo para cada variedad de manera independiente. Los resultados del análisis se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados del análisis semi cuantitativo de la interacción ácaro verde – yuca.

Gen	Ácaro	ECU 72			CMC 40		
	Tiempo	Área	Porcentaje %	D.R	Área	Porcentaje %	D.R
LOX2	0h	22222,610	17,0	1,00	30837,368	23,3	1,00
	6h	24366,024	18,7	1,10	28491,024	21,5	0,92
	24h	27209,731	20,8	1,22	29088,217	22,0	0,94
	4d	26934,731	20,6	1,21	23963,317	18,1	0,78
	8d	29801,489	22,8	1,34	19983,933	15,1	0,65
AOS	0h	6896,075	6,7	1,00	29547,024	24,0	1,00
	6h	11499,681	11,2	1,67	29704,338	24,1	1,01
	24h	25034,702	24,3	3,63	29146,995	23,7	0,99
	4d	29314,167	28,5	4,25	22565,581	18,3	0,76
	8d	30166,974	29,3	4,37	12093,953	9,8	0,41
MYC2	0h	12257,075	11,3	1,00	27139,439	26,1	1,00
	6h	18214,267	16,8	1,49	25427,631	24,4	0,94
	24h	26345,803	24,2	2,15	19618,095	18,8	0,72
	4d	28283,459	26,0	2,31	17498,731	16,8	0,64
	8d	23604,439	21,7	1,93	14414,589	13,8	0,53
OPR2	0h	26846,782	23,3	1,00	17591,246	19,2	1,00
	6h	25853,974	22,4	0,96	13030,317	14,2	0,74
	24h	24511,681	21,3	0,91	24480,388	26,7	1,39
	4d	18405,196	16,0	0,69	20740,217	22,6	1,18
	8d	19614,711	17,0	0,73	16015,539	17,4	0,91
	0h	8048,903	10,1	1,00	15164,317	18,4	1,00
	6h	12047,752	15,1	1,50	18931,288	23,0	1,25

CEV1	24h	16773,459	21,0	2,08	19286,167	23,5	1,27
	4d	20884,752	26,2	2,59	15939,338	19,4	1,05
	8d	22036,317	27,6	2,74	12878,882	15,7	0,85
G3PDH	0h	9816,125	9,9	1,00	26066,368	23,4	1,00
	6h	15138,146	15,2	1,54	16689,974	15,0	0,64
	24h	23313,631	23,4	2,37	27889,095	25,1	1,07
	4d	25445,217	25,5	2,59	22500,146	20,2	0,86
	8d	25935,418	26,0	2,64	18109,418	16,3	0,69
UBQ10	0h	8993,368	14,8	1,00	15177,439	20,5	1,00
	6h	10372,238	17,1	1,15	15741,631	21,3	1,04
	24h	10593,681	17,4	1,18	17081,773	23,1	1,13
	4d	14732,459	24,2	1,64	15385,924	20,8	1,01
	8d	16065,660	26,4	1,79	10578,731	14,3	0,70

La oxigenación del ácido α -linolenico (α -LeA) es el paso inicial para la biosíntesis del AJ. LOX2 se encarga de cumplir esta función (Yan *et al.*, 2013). Según los resultados del análisis semi cuantitativo, las dos variedades activan la vía del ácido jasmónico. Aún así, la dinámica de la expresión es distinta, mientras que en la variedad ECU 72 la expresión aumenta progresivamente desde el tiempo cero horas hasta el día 8, en la variedad CMC 40 disminuye. Esto podría indicar que ECU 72 intensifica sus defensas contra herbívoros a medida que aumenta los ataques de estos, y en CMC 40 disminuye, debido a su susceptibilidad. Una investigación que involucra a *Medicago truncatula* y *Mycosphaerella pinodes*, demostró que el silenciamiento del gen LOX2, reduce la sensibilidad a la fitotoxina coronatina, que se cree que interrumpe las respuestas de defensa del huésped a través de un proceso dependiente de JA (Toyoda *et al.*, 2013). Por tal motivo, se sugiere que LOX2 podría estar asociado a respuestas de defensa de la yuca frente a fitotoxinas.

También, recientemente Mochizuki y colegas (2016), encontraron que en *Arabidopsis* el gen LOX2 está involucrado en la síntesis de compuestos volátiles de hojas verdes (VHV; en inglés GLV, green leaf volatiles), por lo tanto, LOX2 es versátil en su función, iniciando la vía del ácido jasmonico y la síntesis de VHV. Además, se encontró que en células intactas la expresión de LOX2 disminuye y se activa rápidamente ante el daño tisular, explicando la alta concentración de VHV en hojas heridas. Con base en lo mencionado anteriormente y los resultados obtenidos, se sugiere que las dos variedades podrían sintetizar VHV como mecanismo de defensa, al emitir dichos compuestos en búsqueda de potenciales enemigos naturales del ácaro, con la diferencia que en ECU 72 la búsqueda se extendería hasta una semana después del inicio de la infestación y en CMC 40 se reduciría (Tabla 5).

Los niveles de transcripción de LOX2 obtenidos concuerdan con los encontrados en un análisis comparativo de los cambios del proteoma inducidos por ácaros *Tetranychus urticae* y aplicación de metil jasmonato en hojas de cítricos. Los altos niveles de lipoxigenasa en hojas de *C. clementina* se obtuvieron en los dos tratamientos (Maserti *et al.*, 2011). Igualmente, Marín (2015) reportó que para la variedad de yuca resistente NAT-31 la proteína LOX2 mostró los siguientes valores: 6 horas 0,722246; 24 horas 1,45062; 4 días 1,735972 y 8 días 1,003678. Se observa una sobreexpresión que aumenta desde el tiempo 6h hasta el día 4 para disminuir considerablemente al día 8. Estos resultados comparados con los obtenidos en este trabajo, sugiere que la dinámica de la expresión de este gen es

diferente entre las variedades resistentes y que responden diferencialmente ante el ataque del ácaro verde, la cuantificación de la expresión por medio de qPCR podría determinar las diferencias. Igualmente, Marin (2015) reportó para una variedad susceptible (60444) los siguientes valores de regulación de la proteína LOX2: 6 horas 1,40993; 24 horas 1,330034; 4 días 1,497468 y 8 días 1,593322. Estos resultados son diferentes a los encontrados en el presente trabajo y una cuantificación por qPCR lo determinaría así.

Se sabe que la biosíntesis del AJ se realiza a partir de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y se sintetiza por una de las siete ramas distintas que hay de la vía lipoxigenasa, la rama de la sintasa de óxido de aleno (AOS) (Feussner y Wasternack, 2002). Las otras seis ramas forman otras oxilipinas (productos de oxidación de los ácidos grasos insaturados) pero la rama AOS forma exclusivamente la oxilipina AJ a partir de 13-hidroperóxido (HPOT) originado desde el ácido linolénico (producto de la oxigenación de LOX2), lo que quiere decir que esta vía es interesantemente exclusiva, además se sabe claramente que la rama AOS compite con las otras ramas por el sustrato HPOT, lo que demuestra que la actividad de AOS es indispensable para un correcto control de la afluencia de HPOT en la biosíntesis de AJ (Andreou *et al.*, 2009). Además, se puede observar que los niveles de expresión de AOS en las dos variedades son semejantes a los de LOX2, es lo que se espera teóricamente, al ser AOS la segunda molécula que interviene en la vía del ácido jasmonico. Esto determina aún más la activación de la vía. Por otro lado, se observa diferencias marcadas en el área registrada de los tiempos cero, esto podría indicar que AOS se expresa constitutivamente en el genotipo CMC 40 hasta que ocurre el ataque del ácaro y en ECU 72 la expresión es inducida por este.

Taurino en 2012, analizó la biosíntesis del ácido jasmonico en patata. Encontró que dos isoformas del AOS están involucradas en la biosíntesis de JA, que se expresan altamente en respuesta a un daño mecánico, y esta genera una mayor concentración de AJ en la patata, activando genes de defensa frente a heridas y reforzando la pared celular que ayuda a limitar el aumento de patógenos bacterianos. Igualmente trabajos en mutantes deficientes de AOS de *Arabidopsis* atacadas por *Tetranychus urticae*, mostraron un aumento de 5 veces el daño en estas que en controles, además, larvas que se alimentaban de hojas control tardaban el doble en desarrollar protoninfas que en hojas mutantes (Bruinsma, 2014). En contraste, se encontró que la disrupción del gen AOS provocó que plantas de *Arabidopsis* fueran más resistentes al nematodo agallador *Meloidogyne javanica* (Naor *et al.*, 2018), lo que sugiere que la vía del ácido jasmonico frente a nematodos es presuntamente inhibida, pruebas en yuca podría confirmar/desmentir en parte esta teoría. Se sabe también que el ácido salicílico (AS) es antagonista de la vía del ácido jasmonico, que la activación de genes que codifican enzimas importante en la biosíntesis del mismo son reprimidas por AS (Leon *et al.*, 2010). Por tanto, los resultados obtenidos demuestran que AS no cumple ninguna función antagonista en la vía del ácido jasmonico de la yuca cuando el ácaro la ataca, o posiblemente este antagonismo ocurre en la variedad CMC 40 y de manera paulatina.

En el trabajo caracterización molecular de la resistencia en yuca (*Manihot esculenta* Crantz) al ataque del ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*): una aproximación proteómica, realizado

por Marín (2015), se encontró que para una variedad susceptible (60444) la proteína AOS mostró los siguientes valores: 6 horas 1,63559; 24 horas 1,836278; 4 días 1,997972 y 8 días 2,125614. Se observa una sobre regulación que aumenta desde el tiempo 6 horas hasta el día 8, lo que es contrario a lo que se encontró en el genotipo susceptible (CMC 40) trabajado en el presente estudio, en donde CMC 40 muestra una expresión que disminuye progresivamente de menor a mayor tiempo de evaluación. Esto podría sugerir que las dos variedades susceptibles presentan diferencias significativas en la dinámica de la expresión génica que interviene en la vía del ácido jasmónico.

Los factores de transcripción dependientes de la señal de AJ son de gran importancia para una correcta vía de señalización de AJ. MYC2 es el único factor de transcripción que interactúa con la proteína JAZ (represor transcripcional). Este factor de transcripción es el más importante porque activa la transcripción de genes de respuesta temprana que incluyen factores de transcripción como WRKY, MYB y AP2/ERF, genes de biosíntesis de AJ como LOX, AOS, OPR y proteínas JAZ. Lo que quiere decir que sin la acción de esta proteína no es posible la expresión de genes importantes involucrados en las respuestas de defensa frente a estreses bióticos y abióticos (Yan *et al.*, 2013).

Esta interacción entre MYC2 y JAZ explica el ciclo de retroalimentación positiva en la biosíntesis de AJ. La formación de JA-IIE someterá al regulador negativo JAZ a la degradación proteasomal, lo que permite a MYC2 activar los promotores sensibles a JA de los genes de biosíntesis de JA. No obstante, los genes JAZ y MYC responden JA-Ile, permitiendo un reabastecimiento permanente de reguladores negativos (JAZ) y positivos (MYC2) que dan como resultado un ajuste de la expresión de genes de biosíntesis de JA (Chung *et al.*, 2008). Con base en lo expuesto anteriormente y comparado con los resultados obtenidos, podría sugerirse que en el genotipo ECU 72, al iniciar la infestación, la concentración de JA-IIE aumenta y por consiguiente la biosíntesis del AJ se produce, una vez superado el ataque al día 5-8, los niveles de JA-IIE se normalizan y la biosíntesis cesa. En el caso de CMC 40, los resultados son confusos, ya que aparentemente la concentración de JA-IIE inicial es alta pero disminuye a medida que el ataque persiste, y por lo tanto la vía no se activa, esto es coherente ya que la variedad susceptible, pero el alto nivel de expresión MYC2 en el tiempo cero muestra mecanismo molecular poco claro.

Por otro lado, un trabajo realizado por Ratlamwala en 2014, donde trabajaba con *Tetranychus urticae* y su ataque a tres diferentes genotipos de *A. thaliana*, demostró que los niveles de transcripción tanto del gen AOS como MYC2 no se redujeron significativamente ante el ataque del ácaro, lo que sugiere que este no afecta la capacidad de las plantas para montar una respuesta defensiva. Asimismo, recientemente Bruinsma (2014) encontró que en mutantes de *Arabidopsis myc2*, el daño era ~ 5 más severo, desarrollo de protoninfas más rápido y mortalidad muy baja, lo que indica que las defensas más efectivas contra ácaros necesita la expresión del gen MYC2.

La segunda mitad de la vía de la biosíntesis de ácido jasmónico (AJ) se realiza en el peroxisoma, e inicia con la conversión de OPDA, una ciclopentenona a ciclopentanona (3-oxo-2-(2'(Z)-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoic acid, OPC-8:0), catalizada por OPDA reductasa (OPR) (Yan *et al.*, 2013). Además, en *Arabidopsis* y tomate estas familias se

dividieron en dos grupos, el grupo II cataliza la conversión de OPDA a un precursor biosintético intermedio en la biosíntesis de JA, las familias pertenecientes al grupo I es poco probable que lo puedan hacer. Análisis químicos determinaron que OPR3 es responsable de la producción de AJ en tomate y *Arabidopsis* y que OPR1/OPR2 no (Breithaupt *et al.*, 2009; Scalschi *et al.*, 2015). También, en maíz la expresión de OPR2 aumenta en respuesta a heridas mecánicas el inductor de regurgitación de larvas de gusano cogollero (*Spodoptera exigua*) y al tratamiento con volátiles de hoja verde (Engelberth *et al.*, 2007).

En los resultados encontrados se observa una disminución en el nivel de transcripción en la variedad ECU 72, rompiendo con el patrón de los genes LOX2, AOS y MYC2 (Tabla 5). Si una OPR se encarga de llevar a cabo la segunda parte de la biosíntesis del ácido jasmonico, se podría esperar, en teoría, que OPR2 mostrara una expresión similar a los genes ya mencionados, pero no es así, lo que sugiere que OPR2 no está involucrada en la biosíntesis del ácido jasmonico. Con CMC 40 el comportamiento es difícil de explicar. Ahora bien, Marín (2015) encontró que la proteína OPR2 se induce desde las 6h hasta el día 8 en la variedad susceptible 60444, ante el ataque del ácaro verde (*M. tanajoa*). Estos datos son completamente diferentes a los obtenidos en el presente trabajo. Por consiguiente, dilucidar el mecanismo molecular alrededor de este gen ayudaría determinar su papel e importancia dentro de la vía del ácido jasmonico y/o defensa de la yuca, una manera de hacerlo es por medio del silenciamiento de genes OPR, el gran aumento de OPDA sin el aumento proporcional de AJ revelará el OPR indicado.

Se ha demostrado que el gen CEV1 funciona en las etapas tempranas de las vías del ácido jasmónico y del etileno, como reguladores de estas. Además, este gen codifica una celulosa sintasa (CeSA3) asociado a la formación de la pared celular (Ellis y Turner, 2001). Ellis *et al.*, (2002) caracterizaron el mutante *arabidopsis cev1* el cual tiene una expresión constitutiva de los genes de respuesta al estrés y mayor resistencia a patógenos fúngicos, y encontraron que la mutación estaba ubicada dentro de la región del gen de la celulosa sintasa (CeSA3), lo que quiere decir y evidencia que la inhibición de la síntesis de celulosa activa las respuestas de estrés dependientes de ácido jasmónico y etileno. Esto se comprobó en el trabajo realizado por Ramires y colaboradores en el 2011, donde CeSA3 se reprimió luego de la infección de hongos en plantas de *Arabidopsis*. Nuestros resultados muestran niveles de expresión bajos del gen CEV1 en comparación a los otros genes evaluados (Tabla 5). Aun así el gen no se inhibe en ninguna de las dos variedades, lo que podría indicar que su función no está ligada a la defensa de la planta o no está asociada a las vías del AJ y ET.

8.2.2.2 Interacción entre *Aleurotrachelus sociales* y *Manihot esculenta* Crantz

Para el análisis molecular de la interacción entre la mosca blanca (*A. socialis*) y la yuca (*M. esculenta*) se manejaron 5 tiempos. Un tiempo inicial de 0 horas, seguido de 24 horas, 48 horas, 5 días y un tiempo final de 8 días. Al igual que en el sistema ácaro verde – yuca se trabajó con los mismo 5 genes evaluados en tal análisis.

Las imágenes de los geles de agarosa al 2% de los genes evaluados en la interacción ácaro verde – yuca, y de aquellos utilizados como posibles genes de referencia, se encuentran entre las figuras 29 y 36.



Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen AOS en la interacción mosca blanca - yuca. Cero horas; 24h: Veinticuatro horas; 48h: Cuarenta y ocho horas; 5d: Cinco días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.

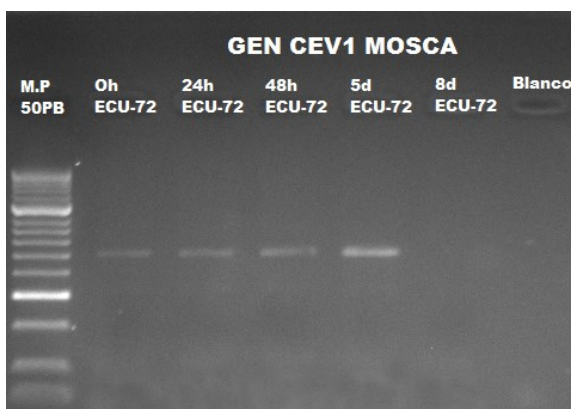


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen CEV1 en la interacción mosca blanca - yuca. 0h: Cero horas; 24h: Veinticuatro horas; 48h: Cuarenta y ocho horas; 5d: Cinco días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente.

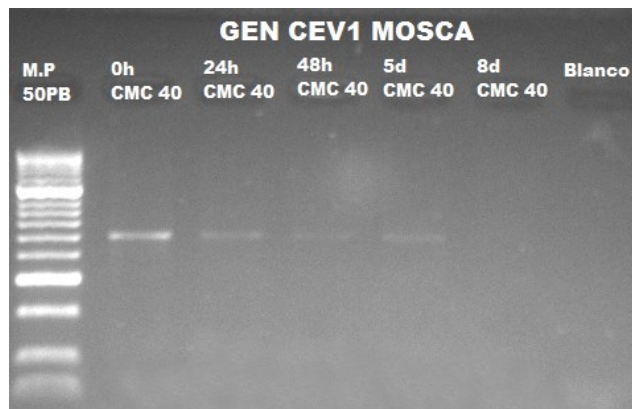


Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen CEV1 en la interacción mosca blanca - yuca. Cero horas; 24h: Veinticuatro horas; 48h: Cuarenta y ocho horas; 5d: Cinco días; 8d: Ocho días; CMC 40: Variedad susceptible.



Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen MYC2 en la interacción mosca blanca - yuca. Cero horas; 24h: Veinticuatro horas; 48h: Cuarenta y ocho horas; 5d: Cinco días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.

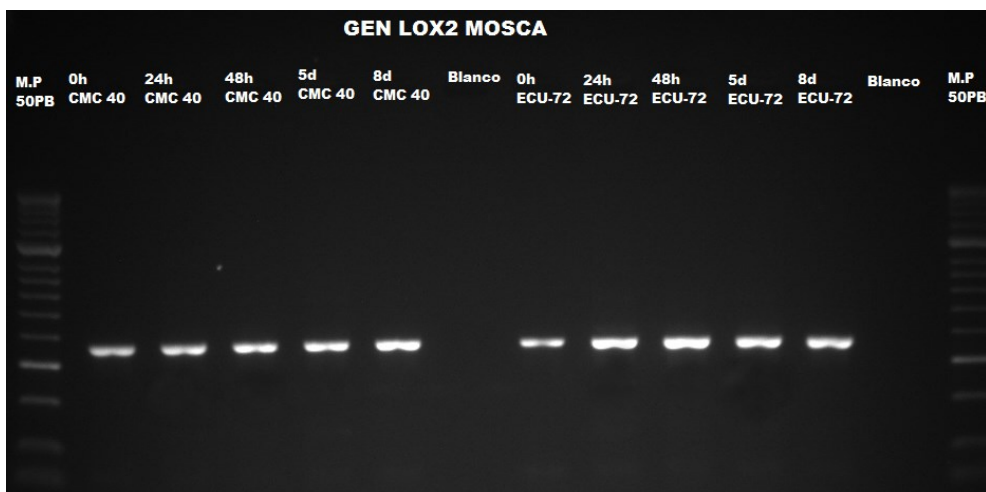


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen LOX2 en la interacción mosca blanca - yuca. 0h: Cero horas; 24h: Veinticuatro horas; 48h: Cuarenta y ocho horas; 5d: Cinco días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.



Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen LOX2 en la interacción mosca blanca - yuca. Cero horas; 24h: Veinticuatro horas; 48h: Cuarenta y ocho horas; 5d: Cinco días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.

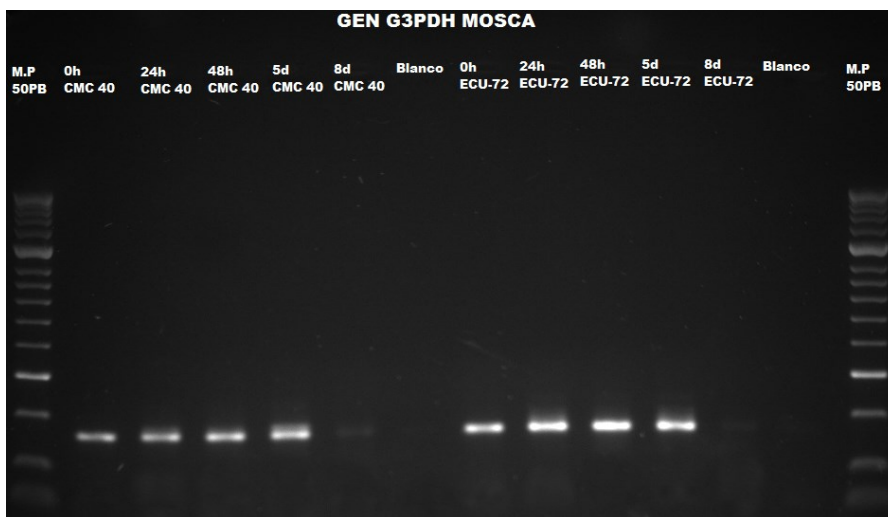


Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen G3PDH en la interacción mosca blanca - yuca. 0h: Cero horas; 24h: Veinticuatro horas; 48h: Cuarenta y ocho horas; 5d: Cinco días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.



Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa 2% del gen UBQ10 en la interacción mosca blanca -

yuca. 0h: Cero horas; 24h: Veinticuatro horas; 48h: Cuarenta y ocho horas; 5d: Cinco días; 8d: Ocho días; ECU-72: Variedad resistente; CMC 40: Variedad susceptible.

El análisis semi cuantitativo de los resultados observados en los geles de agarosa (Figuras 29–36), se realizó con ayuda del software ImageJ al realizar un análisis densitométrico de las bandas obtenidas. Los análisis se llevaron a cabo para cada variedad de manera independiente. Los resultados del análisis se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados del análisis semi cuantitativo de la interacción mosca blanca – yuca.

Gen	Mosca	ECU 72			CMC 40		
	Tiempo	Área	Porcentaje %	D.R	Área	Porcentaje %	D.R
LOX2	0h	15993,489	14,1	1,00	14450,882	13,5	1,00
	24h	25919,924	22,9	1,62	19416,853	18,1	1,34
	48h	27037,388	23,9	1,69	22454,510	20,9	1,55
	5d	23368,731	20,7	1,46	24275,631	22,6	1,68
	8d	20722,246	18,3	1,30	26798,731	25,0	1,85
AOS	0h	3788,447	4,1	1,00	28364,317	26,2	1,00
	24h	23333,731	25,1	6,16	29269,782	27,1	1,03
	48h	22062,853	23,7	5,82	23085,267	21,3	0,81
	5d	29487,681	31,7	7,78	21878,024	20,2	0,77
	8d	14423,660	15,5	3,81	5540,569	5,1	0,20
MYC2	0h	19208,953	18,0	1,00	26352,974	34,7	1,00
	24h	29935,338	28,1	1,56	17839,095	23,5	0,68
	48h	29749,338	27,9	1,55	13275,803	17,5	0,50
	5d	25200,459	23,7	1,31	18221,581	24,0	0,69
	8d	2362,690	2,2	0,12	273,234	0,4	0,00
OPR2	0h	28988,903	27,5	1,00	14936,296	18,8	1,00
	24h	26738,196	25,4	0,92	16719,388	21,0	1,12
	48h	25899,146	24,6	0,89	20417,095	25,7	1,37
	5d	22634,267	21,5	0,78	26676,530	33,6	1,79
	8d	1128,062	1,1	0,04	697,598	0,9	0,00
CEV1	0h	1204,062	12,8	1,00	4733,912	67,6	1,00
	24h	1416,941	15,1	1,18	1127,426	16,1	0,24
	48h	2178,962	23,2	1,81	376,870	5,4	0,08
	5d	4577,912	48,8	3,80	761,163	10,9	0,16
	8d	0	0,0	0,00	0	0,0	0,00
G3PDH	0h	18572,418	19,6	1,00	9436,882	12,9	1,00
	24h	25902,146	27,3	1,39	14980,731	20,5	1,59
	48h	25313,731	26,7	1,36	19276,731	26,4	2,04
	5d	23275,803	24,6	1,25	24978,803	34,2	2,65
	8d	1670,426	1,8	0,09	4424,276	6,1	0,47
UBQ10	0h	3715,731	3,8	1,00	7045,974	16,2	1,00
	24h	8360,288	8,6	2,25	12803,418	29,4	1,82
	48h	10310,752	10,6	2,78	10130,459	23,2	1,44
	5d	66736,014	68,9	17,96	7330,61	16,8	1,04
	8d	7785,874	8,0	2,10	6264,803	14,4	0,89

El comportamiento de los genes LOX2 y AOS en la interacción mosca-yuca en las dos variedades es levemente distinto al observado en la interacción ácaro-yuca. Con respecto a ECU 72, estos dos genes difieren en su expresión en el día 8. Encontrar un patrón similar entre LOX2 y AOS determina la activación de la vía del ácido jasmonico ante el ataque de la mosca, con la diferencia que la supresión ocurre entre el día 4-8. Por otro lado, CMC 40 muestra una expresión interesante. El gen LOX2 se comporta igual en las dos interacciones, aumentando el nivel de transcripción a medida que pasa el tiempo. No obstante, para el gen AOS la expresión es al contrario, disminuye. Con base en lo planteado anteriormente, se podría sugerir que en la interacción mosca-yuca, el genotipo resistente inicia la biosíntesis de AJ (LOX2) y cesa al día 4-8, pero la acción del gen AOS se mantiene fuertemente hasta el día 5; el genotipo CMC 40 aparentemente inicia la vía del ácido jasmonico fuertemente a lo largo de la infestación (LOX2) pero al no incrementar los niveles de transcripción del gen AOS, se sugiere que la vía no es completada (Tabla 5).

Ahora bien, el trabajo realizado por Zhang y colegas en 2013, demostraron que el ataque de mosca blanca sobre plantas de *Arabidopsis* activan genes relacionados con la síntesis del ácido jasmonico, como LOX2, pero inhibe aquellos genes receptivos a AJ que se encuentran aguas abajo, esto lo realiza específicamente el AS. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo y podría explicar los bajos niveles de transcripción del gen CEV1, al posiblemente encontrarse aguas abajo. Otro estudio realizado por Zhang y colaboradores en el mismo año, determinaron que los niveles de LOX2 disminuyeron 1 y 3 días después de la infestación con *Bemisia tabaci*, y en tratamientos exogenos con AS, los niveles aumentaron a las 2h y 6h de la aplicación, pero aumentó después de 24h. Concluyendo que la activación del AS, suprime las defensas directas basadas en JA. Además, un estudio realizado en tomate, encontró que la saliva de la mosca blanca *B. tabaci*, provocó que los niveles de expresión de LOX y AOS fueran significativamente menores que en plantas control (Su *et al.*, 2015). Lo anterior sugiere que el genotipo ECU 72 es resistente hasta los días 5-8.

Como se mencionó anteriormente, MYC2 es un factor de transcripción que activa la expresión de genes relacionados con la respuesta temprana de defensa y la vía del ácido jasmónico. Los resultados encontrados en la interacción mosca-yuca revelan que en ECU 72 el gen MYC2 se expresa fuertemente hasta el día 8, cuando posiblemente el ataque se ha superado, estos datos concuerdan con los obtenidos en los genes LOX2 y AOS, ya que al disminuir la presencia de MYC2, la expresión de estos es inhibida. Con respecto a CMC 40, sucede algo parecido, al día 8 la expresión cesa considerablemente al igual que el gen AOS, pero no en LOX2, esto confirma de cierta forma la teoría mencionada anteriormente, la sobreexpresión de LOX2 activa la biosíntesis del AJ pero no se completa debido a la supresión paulatina del gen AOS, ratificando su condición de variedad susceptible.

Li y colegas en el 2014, encontraron que β C1 del virus de la viruta amarilla de la hoja del tomate, un begomovirus monopartito, es un factor genético viral que suprime la biosíntesis del terpeno vegetal. β C1 interactúa con el factor de transcripción MYC2 de modo que la activación de genes asociados a terpenos se vea comprometida y por consiguiente la resistencia a la mosca blanca se reduzca considerablemente. Esto podría explicar los

niveles de transcripción tan bajos encontrados en las dos variedades a los 8 días de interacción. Esta relación entre el patógeno y la mosca blanca se conoce como mutualismo indirecto, ya que el patógeno puede provocar que la yuca infectada promueva el rendimiento de la mosca, lo que ayuda a la propagación del vector. Asimismo, esta relación entre β C1 y MYC2 sugeriría que la expresión de genes como LOX2 y AOS cesara, pero no es así, lo que implica que el patógeno promueve el rendimiento de la mosca no a través de una represión directa de la vía de síntesis de JA.

En la expresión del gen OPR2 se encontró que el genotipo resistente presenta una mayor expresión que el genotipo susceptible y que en ambos genotipos al 8 día la expresión cesa significativamente. Como se ha mencionado anteriormente los OPR se encargan de catalizar OPDA, en la segunda parte de la biosíntesis de AJ, según los resultados obtenidos OPR2, en la variedad resistente, muestra niveles de transcripción similares a los de esta misma variedad pero en la interacción ácaro-yuca, lo que sugiere que la función es la misma ante el ataque de los dos artrópodos plaga. Dilucidar la función de este gen permitirá comprender su importancia en la vía del ácido jasmonico.

Los resultados obtenidos de la expresión de CEV1 en las dos variedades, muestran los niveles de transcripción más bajos obtenidos de todos los genes en los 5 tiempos evaluados, esto podría indicar que tal gen es relativamente reprimido por la alimentación de *A. socialis*.

El gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) usado como gen de referencia mostró una expresión poco estable tanto en las dos variedades de yuca como en el ataque de los dos artrópodos plaga. Lo que sugiere que este gen utilizado normalmente como gen de referencia, no cumple su objetivo en las condiciones experimentales del presente trabajo. El trabajo realizado por Expósito-Rodríguez *et al.*, (2008) en el desarrollo del tomate determinó que precisamente el gen G3PDH mostraba patrones de expresión inestables y por lo tanto era el control interno menos fiable. UBQ10 mostró en la interacción ácaro verde-yuca, una expresión un poco más estable que G3PDH, lo que podría sugerir el uso como control interno en una futura investigación con genes relacionados a la vía del ácido jasmónico o incluso genes asociados con la defensa de la planta frente a este artrópodo plaga. Moreno *et al.*, (2011) establecieron que UBQ10 presenta un patrón de expresión muy estable en diferentes tejidos infectados con cassava brown streak virus (CBSV) y variedades de yuca. El cambio de Taq polimerasa pudo influir en los resultados obtenidos.

9. CONCLUSIONES

Se estableció la preferencia del ácaro verde de ovipositar sobre el genotipo CMC 40 y no sobre ECU-72, lo que confirma las respectivas características de susceptible y resistente.

No existen diferencias significativas entre las regiones reguladores de los genes de *Arabidopsis* y los ortólogos en yuca. Además, se identificaron elementos *cis* que están fuertemente relacionados con la respuesta de la yuca ante estreses bióticos y abióticos, a excepción del ortólogo MYC2, el cual presenta el número más reducido de motivos *cis* y ninguno involucrado en la respuesta a AJ, AS, AG, ET y auxinas.

Cuatro de los genes evaluados (AOS, MYC2, LOX y OPR2) mostraron una regulación positiva tanto en el ataque del ácaro como en el de la mosca, CEV1 no se expresó notoriamente durante la interacción mosca-yuca.

G3PDH no presenta una expresión estable durante el ataque del ácaro y la mosca sobre la yuca y por consiguiente se recomienda no usarlo como control interno. El gen UBQ10 mostró una expresión estable en la interacción ácaro-yuca y por lo tanto se recomienda como control interno en una futura investigación con genes relacionados a la vía del ácido jasmónico o incluso genes asociados con la defensa de la planta frente a este artrópodo plaga.

El ácido jasmónico está fuertemente asociado a la respuesta de defensa de la yuca frente al ataque de los artrópodos plaga y lo hace interaccionando con otras fitohormonas como el etileno, ácido salicílico, ácido abscísico, auxinas y giberelinas.

Se observa una correlación en la interacción ácaro-yuca de los genes LOX2, AOS y MYC2, demostrando parcialmente la activación de la vía del ácido jasmónico en la yuca.

Se logró comprender parcialmente los mecanismos subyacentes de las respuestas de la yuca a dos plagas lo cual permitirá desarrollar estrategias de protección de cultivos en un contexto de múltiples atacantes.

Los resultados obtenidos de la expresión diferencial de genes relacionados con la vía del ácido jasmónico podrían proporcionar recursos muy valiosos en programas de mejoramiento molecular de yucas resistentes a enfermedades y artrópodos plaga.

PERSPECTIVAS

Evaluar los cinco genes trabajados en el presente trabajo mediante la cuantificación por qPCR.

Realizar edición de genomas con alguno de los genes evaluados, preferiblemente MYC2.

Realizar análisis de interacciones proteína-ADN específicamente con MYC2.

Hacer el mismo análisis presentado en el presente trabajo con más genotipos de yuca, especialmente silvestres, para determinar su expresión diferencial y ver posibles similitudes y/o diferencias.

Hacer PCR, qPCR y secuenciación de las secuencias promotoras analizadas para comprobar su presencia, funciones y demás.

Evaluar otros genes relacionados con la vía del ácido jasmonico como PDF1.2 y VSP para determinar su importancia en la yuca.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal GK, Tamogami S, Han O, Iwahashi H, and Rakwal R (2004) Rice octadecanoid pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 317:1-15.
- Akinbo, O., Labuschagne, M., & Fregene, M. (2012). Introgression of whitefly (*Aleurotrachelus socialis*) resistance gene from F1 inter-specific hybrids into commercial cassava. *Euphytica*, 183(1), 19-26.
- Alcalá, E. I. L., Hernández, J. L. M., Iliná, A., Cisneros, L. G., & Castillo, F. D. H. (2017). Aplicación de ácido jasmónico como inductor de resistencia vegetal frente a patógenos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(3), 673-683.
- Andreou A, Brodhun F, and Feussner I (2009) Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog Lipid Res* 48:148-170.
- Álvarez E, Bellotti AC, Calvert L, Arias B, Cadavid LF, Pineda B, Llano G, Cuervo M. 2002. Guía Práctica para el manejo de las enfermedades, las plagas y las deficiencias nutricionales de la Yuca. CLAYUCA-CIAT.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., and Orntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64, 5245–5250. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
- Arias B. 1995. Estudio sobre el comportamiento de la mosca blanca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homóptera: Aleyrodidae) en diferentes genotipos de yuca *Manihot esculenta* Crantz. Tesis (Maestría en fitomejoramiento). Universidad Nacional de Colombia, Palmira, CO. 181 p.
- Badegana, A. M., Mborohoul, J. B., & Alzouma, I. (2001). Sensibility to *Mononychellus tanajoa* Bondar (Acari: Tetranychidae) of some cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars and effect of damage on yield loss in the Cameroonian Western highlands. *Tropicultura* (Belgium).
- Bannenberg G, Martinez M, Hamberg M, and Castresana C (2009) Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids* 44:85-95.
- Bari R, Jones J: Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 2009, 69:473-488.
- Bell E, Creelman R, Mullet J. 1995. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 8675–8679.
- Bellotti AC. 1983. Descripción de las plagas que atacan la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y características de sus daños. CIAT.

- Bellotti AC, Vargas O. 1986. Mosca Blanca del cultivo de yuca: Biología y Control. Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Serie: 04SC-04.05. 34 p.
- Bellotti AC, Smith L, Lapointe SL. 1999. Recent advances in cassava pest management. *Annual review of entomology*, 44, 343-370.
- Bellotti AC. 2002. Insectos y Ácaros de la yuca y su control. En: *El Cultivo De La Yuca En El Tercer Milenio. Sistemas Modernos De Producción, Procesamiento, Utilización Y Comercialización*. Cali: CIAT
- Bellotti AC, Bohórquez AC, Vargas J, Arias B, Vargas HL, Trujillo G, Tohme J. 2003. Avances recientes en la identificación de genes de resistencia a mosca blanca, *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). In *Memorias XXX Congreso Sociedad Colombiana de Entomología*, socolen. July pp. 17-19.
- Bellotti, A. C., Melo Molina, E. L., Arias, V. B., Herrera Fernández, C. J., Hernández, M., Holguín, A., ... & Trujillo García, H. E. (2005). Biological control in the neotropics: a selective review with emphasis on cassava.
- Bellotti, A.C. 2008. Cassava pests and their management. J.L. Capinera (Ed.). *Encyclopedia of Entomology*. 2nd Ed. Springer. Dordrecht, the Netherlands.
- Bellotti, A. C., Herrera Fernández, C. J., Melo Molina, E. L., Arias, V. B., Guerrero, J. M., & Hernández, M. (2009). Control de plagas en el cultivo de la yuca: Ácaros y Mosca Blanca.
- Bellotti, A., Campo, B. V. H., & Hyman, G. (2012). Cassava production and pest management: present and potential threats in a changing environment. *Tropical Plant Biology*, 5(1), 39-72.
- Bellotti AC, Herrera CL, Hernández M, Arias B, Guerrero JM, Melo EL. 2012. Cassava Pests in Latin America, Africa and Asia. In R. H. Howeler, ed. *The Cassava Handbook –A reference manual based on the Asian regional cassava training course*, held in Thailand. Cali, Colombia, CIAT. pp. 199-257.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., Solano, R. Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSEFACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J*. 2002, 29, 23-32.
- Browse J. 2005. Jasmonate: an oxylipin signal with many roles in plants. *Vitamins and Hormones*. 72:431-56.
- Boaventura, V. D. J. (2013). Avaliação de variedades híbridos interespecíficos e espécies silvestres de *Manihot* como fonte de resistência ao ácaro verde *Mononychellus tanajoa* (Bondar, 1938) (Acari, Tetranychidae).

- Boaventura, Verônica de Jesus, Ringenberg, Rudiney, & Ledo, Carlos Alberto da Silva. (2015). Genetic dissimilarity for resistance to *Mononychellus tanajoa* (bondar) (Acari, Tetranychidae) among domesticated and wild *Manihot* species. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 37(4), 441-446.
- Bohórquez AC. 2011. Aislamiento de secuencias expresadas diferencialmente durante la respuesta de defensa al ataque de la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*) en el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) mediante genómica funcional. Tesis (Ph. D.) (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias).
- Bonilla JP, Cerda H, Arnal E. 1999. Revisión de los estudios realizados para la detección e identificación de los geminivirus transmitidos por la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius), utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Ciencia*, 7(1).
- Bedoya, Ó., & Bustamante, S. (2011). CNN-Promoter, new consensus promoter prediction program based on neural networks. *Revista EIA*, (15), 153-164.
- Brand, Y., Hovav, R., 2010. Identification of suitable internal control genes for quantitative real-time PCR expression analyses in peanut (*Arachis hypogaea*). *Peanut Sci.* 37, 12–19.
- Breithaupt C, Kurzbauer R, Schaller F, Stintzi A, Schaller A, Huber R, Macheroux P, and Clausen T (2009) Structural basis of substrate specificity of plant 12-oxophytodienoate reductases. *J Mol Biol* 392:1266-1277
- Brown JK, Frohlich DR, Rosell RC. 1995. The sweetpotato or silverleaf whitefly: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex. *Ann. Rev. Entomol.* 40:511-534.
- Bostock, R.M. 2005. Signal Crosstalk and Induced Resistance: Straddling the line between cost and benefit. *Annual Review Phytopathology* 43:545–80.
- Bruinsma, K. A. (2014). *Arabidopsis thaliana*-Spider Mite Interaction: Plant Perception, Signalling, and Response.
- Bucio JL, Vergara AG, González JR, Peña EB. 2012. Señalización del ácido jasmónico y el óxido nítrico durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *Ciencia Nicolaita*, (55), 28-41.
- Burbano M, Carabalí A, Montoya J, Bellotti AC. 2007. Resistance of *Manihot* species to *Mononychellus tanajoa* (Acariformes), *Aleurotrachelus socialis*, and *Phenacoccus herreni* (Hemiptera). *Revista Colombiana de Entomología*, 33(2), 110-115.
- Cadavid LF. 2005. Producción de Yuca. Cali. CIAT.

- Carabali, A., Montoya-Lerma, J., & Bellotti, A. C. (2008). Development and reproduction of *Bemisia tabaci* B" (Hemiptera: Aleyrodidae) on cassava (*Manihot esculenta*) genotypes. *Revista Colombiana de Entomología*, 34(1), 28-32.
- Carabali, A., Bellotti, A. C., Montoya-Lerma, J., & Fregene, M. (2010). *Manihot flabellifolia* Pohl, wild source of resistance to the whitefly *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Hemiptera: Aleyrodidae). *Crop protection*, 29(1), 34-38.
- Carabali, A., Bellotti, A. C., Montoya-Lerma, J., & Fregene, M. (2010). Resistance to the whitefly, *Aleurotrachelus socialis*, in wild populations of cassava, *Manihot tristis*. *Journal of Insect Science*, 10(1), 170.
- Ceballos, H., Fregene, M., Lentini, Z., Puentes, J., Perez, J., Rosero, A., Tofiño, A. 2006. Development and identification of high-value cassava clones. *Acta Hortícola* 703: 63-70.
- Centro internacional de agricultura tropical (CIAT). 2006. Improved cassava for the developing world Annual Report 2006. Project IP-3. Cali, Colombia, CIAT.
- Chen, T., Yang, Q., Gruber, M., Kang, J., Sun, Y., Ding, W., ... & Zhang, X. (2012). Expression of an alfalfa (*Medicago sativa* L.) ethylene response factor gene MsERF8 in tobacco plants enhances resistance to salinity. *Molecular biology reports*, 39(5), 6067-6075.
- Chen, L., Wang, Q. Q., Zhou, L., Ren, F., Li, D. D., & Li, X. B. (2013). Arabidopsis CBL-interacting protein kinase (CIPK6) is involved in plant response to salt/osmotic stress and ABA. *Molecular biology reports*, 40(8), 4759-4767.
- Chung HS, Koo AJ, Gao X, Jayanty S, Thines B, Jones AD, and Howe GA (2008) Regulation and function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol* 146:952-964.
- Clarke, J.D., Volko, S.M., Ledford, H., Ausubel, F.M., Dong, X. Roles of salicylic acid, jasmonic acid and ethylene in cpr -induced resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2000, 12, 2175-2190.
- Coker, J. S., and Davies, E. (2003). Selection of candidate housekeeping controls in tomato plants using EST data. *BioTechniques* 35, 740–742.
- Cortes S, Lopez C, Chavarriaga P. 2010. Biocombustibles y biotecnología: la yuca (*Manihot esculenta*) como modelo de investigación. *Acta Biológica Colombiana*, 15(1), 3.
- Dalton R. 2006. Whitefly infestations - The Christmas invasion. *Nature* 443: 898-900.
- Dewdney J., Conley T. R., Shih M. C. and Goodman H. M. 1993 Effects of blue and red light on expression of nuclear genes encoding chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol*. 103, 1115–1121.

- Dicke, M., Baldwin, I. 2010. The evolutionary context for herbivore induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends in Plant Science* 15: 3, 167-175.
- Doares, S.H., Narvaez-Vasquez, J., Conconi, A., Ryan, C.A. Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol.* 1995, 108, 1741-1746.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C., Turner, J.G. The Arabidopsis mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell.* 2002, 14, 1557-1566.
- Espinosa, M. Á., Lima, A. A., Ságio, S. A., Coelho, C. P., Alemán, E. I., González-Olmedo, J., & Chalfun-Junior, A. (2012). Identificación in silico de proteínas DELLA en plantas de *Coffea arabica* L. y *Ananas comosus* L. Merr. *Biotecnología Vegetal*, 12(3).
- Exposito-Rodriguez, M., Borges, A. A., Borges-Perez, A., and Perez, J. A. (2008). Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol.* 8:131. doi: 10.1186/1471- 2229-8-131.
- Faccioli, P., Ciceri, G. P., Provero, P., Stanca, A. M., Morcia, C., and Terzi, V. (2007). A combined strategy of “in silico” transcriptome analysis and web search engine optimization allows an agile identification of reference genes suitable for normalization in gene expression studies. *Plant Mol. Biol.* 63, 679–688. doi: 10.1007/s11103-006-9116-9.
- Faria, M., Wraight, S. 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Protection* 20 (9): 767-778. Farmer, E.E. 2001. Surface-to-air signals. *Nature* 411(6839): 854-856.
- Farmer EE, Almeras E, Krishnamurthy V. 2003. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:372-378.
- Fauquet, C, Fargette D. 1990. African cassava mosaic virus. Etiology, epidemiology and control. *Plant Disease* 74: 404 - 411.
- Feussner I, and Wasternack C (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* 53:275-297.
- Ferguson ME, Hearne SJ, Close TJ, Wanamaker S, Moskal WA, Town CD, Young J, Marri PR, Rabbi IY, Villiers EP. 2012. Identification, validation and highthroughput genotyping of transcribed gene SNPs in cassava. *TAG Theoretical and applied genetics* 124, 685-695.
- Fujimoto S.Y; Ohta M; Usui A; Shinshi H; Ohme-Takagi M (2000) Arabidopsis ethylene responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* 12: 393-404

- Gan, Y., Guan, J., & Zhou, S. (2009). A pattern-based nearest neighbor search approach for promoter prediction using DNA structural profiles. *Bioinformatics*, 25(16), 2006-2012.
- Gao, Z., Meng, C., Zhang, X., Xu, D., Miao, X., Wang, Y., & Ye, N. (2012). Induction of salicylic acid (SA) on transcriptional expression of eight carotenoid genes and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and microbial technology*, 51(4), 225-230.
- Garg, R., Sahoo, A., Tyagi, A., Jain, M., 2010. Validation of internal control genes for quantitative gene expression studies in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 283–288.
- Gedil, M., Kumar, M., & Igwe, D. (2012). Isolation and characterization of resistant gene analogs in cassava, wild *Manihot* species, and castor bean (*Ricinus communis*). *African Journal of Biotechnology*, 11(85), 15111-15123.
- Gerhardt, G. J., & Echeverrigaray, S. (2011). Rules extraction from neural networks applied to the prediction and recognition of prokaryotic promoters. *Genetics and molecular biology*, 34(2), 353-360.
- Gutierrez J. 1987. The cassava green mite in Africa: one or two species? (Acari, Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology* 3: 163-168.
- Ha, C. D., & Wyckhuys, K. A. (2017). In silico identification and characterization of the lectin gene families in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *TAP CHI SINH HOC*, 39(3), 320-332.
- Halim, V.; Vess, A.; Scheel, D. and Rosahl, S. 2006. The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defense. *Plant Biol.* 19:203-208.
- Harms, K., Ramirez, I.I., Peña-Cortes, H. Inhibition of wound-induced accumulation of allene oxide synthase transcripts in flax leaves by aspirin and salicylic acid. *Plant Physiol.* 1998, 118, 1057-1065.
- Hasibuan S and Nazir N. 2017. The development strategy of sustainable bioethanol industry on iconic Sumba island, Eastern Indonesia. *Int J Adv Sci Eng Inf Technol* 7: 276-283.
- Herren HR, Neuenschwander P. 1991 Biological control of cassava pests in Africa. *Annual Review of Entomology* 36, 257-283.
- Holguín A, Claudia María, & Bellotti, Anthony C. (2004). Efecto de la aplicación de insecticidas químicos en el control de la mosca blanca *Aleurotrachelus socialis* (Homoptera: Aleyrodidae) en el cultivo de yuca *Manihot esculenta* Crantz. *Revista Colombiana de Entomología*, 30(1), 37-42.

- Holguín A, Claudia María, Carabali, Arturo, & Bellotti, ANTHONY C. (2006). Tasa Intrínseca de Crecimiento de *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Hemiptera: Aleyrodidae) en Yuca *Manihot esculenta*. *Revista Colombiana de Entomología*, 32(2), 140-144.
- Hou X, Lee LY, Xia K, Yan Y, and Yu H (2010) DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev Cell* 19:884-894.
- Howard, D.; Benson, K. (2002). Evolutionary computation method for pattern recognition of cis-acting sites. *BioSystems*, Vol.72, pp.19-27.
- Howe, G.A. 2004. Jasmonates as signals in the wound response. *Journal Plant Growth Regulation* 23:223–37.
- Howe, G., J. Browse, 2008. New weapons and a rapid response against insect attack. *Plant Physiology* 146: 832-8.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., Zimmermann, P., 2008. Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv. Bioinformatics* 2008, 420747.
- Hruz, T., Wyss, M., Docquier, M., Pfaffl, M.W., Masanetz, S., Borghi, L., Verbrugghe, P., Kalaydjieva, L., Bleuler, S., Laule, O., 2011. RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BMC Genomics* 12, 156
- Ibraheem, O., Botha, C. E., & Bradley, G. (2010). In silico analysis of cis-acting regulatory elements in 5' regulatory regions of sucrose transporter gene families in rice (*Oryza sativa* Japonica) and *Arabidopsis thaliana*. *Computational biology and chemistry*, 34(5-6), 268-283.
- Itzhaki, H., Maxson, J.M., Woodson, W.R., 1994. An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the Carnation glutathione-S-transferase (GST1) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (19), 8925–8929.
- Jáuregui, R.; Abreu-Goodger, C.; Moreno-Hagelsieb, G., Collado-Vides, J.; Merino, E. (2003) Conservation of DNA curvature signals in regulatory regions of prokaryotic genes. *Nucleic Acids Research*, Vol. 31, No. 23, pp. 6770-6777.
- Jansson, C., Westerbergh, A., Zhang, J., Hu, X., Sun, C. 2009. Cassava, a potential biofuel crop in (the) People's Republic of China. *Applied Energy* 86, Supplement 1: S95-S99
- Jiang, Y., Liang, G., Yang, S., & Yu, D. (2014). *Arabidopsis* WRKY57 functions as a node of convergence for jasmonic acid–and auxin-mediated signaling in jasmonic acid–induced leaf senescence. *The Plant Cell*, tpc-113.
- Jordán M, Casaretto J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico. *Fisiología vegetal*. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

- Jorge V, Verdier V. 2002. Qualitative and quantitative evaluation of cassava bacterial blight resistance in F1 progeny of a cross between elite cassava clones. *Euphytica* 123, 41-48
- Júnior, I. D. (2009). Biological control of the cassava green mite in Africa with Brazilian isolates of the fungal pathogen *Neozygites tanajoae*. In *Use of Microbes for Control and Eradication of Invasive Arthropods* (pp. 259-269). Springer, Dordrecht.
- Kessler, A., Baldwin, I. 2002. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annual Review Plant Biology* 53: 299-328.
- Korth K. L., Jaggard D. A. and Dixon R. A. 2000 Developmental and light regulated post translational control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase levels in potato. *Plant J.* 23, 507–516.
- Laloum, T., De Mita, S., Gamas, P., Baudin, M., & Niebel, A. (2013). CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many?. *Trends in plant science*, 18(3), 157-166.
- Laredo-Alcalá, Elan Iñaky, Michelena-Álvarez, Georgina, Iliná, Anna, Borjas-Ramos, Javier, Hernández-Castillo, Francisco Daniel, & Martínez-Hernández, José Luis. (2016). Uso de *Botryodiplodia theobromae* como productor de ácido jasmónico en dos sistemas de fermentación. *Revista mexicana de micología*, 44, 1-9.
- Legg JP, Fauquet CM. 2004. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. *Plant Mol. Biol.* 56:585-599.
- Leon-Reyes, A., Van der Does, D., De Lange, E. S., Delker, C., Wasternack, C., Van Wees, S. C., ... & Pieterse, C. M. (2010). Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in *Arabidopsis* is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. *Planta*, 232(6), 1423-1432.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., & Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*, 30(1), 325-327.
- Li, J., Brader, G., & Palva, E. T. (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *The Plant Cell*, 16(2), 319-331.
- Li, R., Weldegergis, B. T., Li, J., Jung, C., Qu, J., Sun, Y., & Chua, N. H. (2014). Virulence factors of geminivirus interact with MYC2 to subvert plant resistance and promote vector performance. *The Plant Cell*, tpc-114.
- Lindlöf, A., Bräutigam, M., Chawade, A., Olsson, O., & Olsson, B. (2009). In silico analysis of promoter regions from cold-induced genes in rice (*Oryza sativa* L.) and *Arabidopsis thaliana* reveals the importance of combinatorial control. *Bioinformatics*, 25(11), 1345-1348.

- Linkies, A., & Leubner-Metzger, G. (2012). Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant cell reports*, 31(2), 253-270.
- Lopez-Ochoa L., Acevedo-Hernandez G., Martinez-Hernandez A., Arguello-Astorga G. and Herrera-Estrella L. 2007 Structural relationships between diverse cis-acting elements are critical for the functional properties of a *rbcS* minimal light regulatory unit. *J. Exp. Bot.* 58, 4397–4406
- Lundgren, J. G., López-Lavalle, L. A. B., Parsa, S., & Wyckhuys, K. A. (2014). Molecular determination of the predator community of a cassava whitefly in Colombia: pest-specific primer development and field validation. *Journal of pest science*, 87(1), 125-131.
- Marín Colorado JA. 2015. Caracterización Molecular de la Resistencia en Yuca (*Manihot esculenta* Crantz) al ataque del ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*): una aproximación proteómica. Tesis de doctorado. Universidad del Valle - Univalle.
- Maserti, B. E., Del Carratore, R., Della Croce, C. M., Podda, A., Migheli, Q., Froelicher, Y. & Rossignol, M. (2011). Comparative analysis of proteome changes induced by the two spotted spider mite *Tetranychus urticae* and methyl jasmonate in citrus leaves. *Journal of plant physiology*, 168(4), 392-402.
- Matsui H, Nakamura G, Ishiga Y, Toshima H, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, and Ichinose Y (2004) Structure and expression of 12-oxophytodienoate reductase (subgroup I) genes in pea, and characterization of the oxidoreductase activities of their recombinant products. *Molecular Genetics and Genomics* 271:1-10.
- Maruyama. N, Todaka, D, Mizoi, J, Yoshida, T, Kidokoro, S, Matsukura, S, & Kojima, M. I. K, (2011). Identification of cis-acting promoter elements in cold-and dehydration-induced transcriptional pathways in *Arabidopsis*, rice, and soybean. *DNA research*, 19(1), 37-49.
- Mederos V. 2006. Embriogénesis somática en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Avila. Centro de Bioplasmas. Ciego de Avila, Cuba. p. 5.
- Mesa, N., Bellotti, A., Duque, M. 1987. Tablas de vida de *Mononychellus progresivus* Doreste y *Tetranychus urticae* (Koch) (Acarina: Tetranychidae) en yuca. *Revista Colombiana de Entomología* 13 (2): 11-22.
- Moreno I, Gruissem W, Vanderschuren H. 2011. Reference genes for reliable potyvirus quantitation in cassava and analysis of Cassava brown streak virus load in host varieties. *Journal of virological methods*, 177(1), 49-54.
- Mullis KB. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific*.

- Mochizuki, S., Sugimoto, K., Koeduka, T., & Matsui, K. (2016). Arabidopsis lipoxygenase 2 is essential for formation of green leaf volatiles and five-carbon volatiles. *FEBS letters*, 590(7), 1017-1027.
- Nafie, E.; Hathout, T. e Mokadem, A.S.A. (2011) - Jasmonic acid elicits oxidative defense and detoxification systems in *Cucumis melo* L. cells. *Brazilian Journal Plant Physiology*, vol. 23, n. 2, p. 161-174.
- Nhassico, D., Muquingue, H., Cliff, J., Cumbana, A., Bradbury, J.H. 2008. Rising African cassava production, diseases due to high cyanide intake and control measures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 2043-2049.
- Nemchenko A, Kunze S, Feussner I, and Kolomiets M (2006) Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments. *J Exp Bot* 57: 3767–3779.
- Niki, T., Mitsuhashi, I., Seo, S., Ohtsubo, N., Ohashi Y. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol*. 1998, 39, 500-507.
- O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H.M.O., Bowles, D.J. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science*. 1996, 274, 1914-1917.
- Olaya CA. 2013. Caracterización genómica parcial y biológica de reovirus que infecta yuca *Manihot esculenta* Crantz (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
- Omer, A.; Granett, J.; Karban, R. and Villa, E. 2001. Chemically-induced resistance against multiple pests in cotton. *Int. J. Pest. Mgmt.* 47:49-54.
- Ospina B, Ceballos H. 2002. La yuca en el tercer Milenio: Sistemas Modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización (Vol. 327). CIAT.
- Pandey, S. P.; Krishnamachari, A. (2006). Computational analysis of plant RNA Pol-II promoters. *Biosystems*, Vol.83, pp. 38-50.
- Patanun, O., Lertpanyasampatha, M., Sojikul, P., Viboonjun, U., & Narangajavana, J. (2013). Computational identification of microRNAs and their targets in cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). *Molecular biotechnology*, 53(3), 257-269.
- Patil BL, Fauquet CM (2010). Differential interaction between cassava mosaic geminiviruses and geminivirus satellites. *J. Gen. Virol.* 91:1871-1882.
- Pérez QAL. 2012. Caracterización de miRNAs involucrados en respuesta a infección por bacterias del género *Xanthomonas* en arroz y yuca (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia). Plagas y las deficiencias nutricionales de la Yuca. CLAYUCA-CIAT.

- Pérez-Quintero, Á., & López, C. (2013). Identificación de elementos cis-regulatorios y predicción bioinformática de factores de transcripción involucrados en la regulación de miARNs en plantas. *Acta Biológica Colombiana*, 18(1).
- Piesik, D., Pan'ka, D., Delaney, K.J., Skoczek, A., Lamparski, R., Weaver, D.K. 2011. Cereal crop volatile organic compound induction after mechanical injury, beetle herbivory (*Oulema* spp.), or fungal infection (*Fusarium* spp.). *Journal Plant Physiology* 168: 878–886.
- Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SC: Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 2009, 5:308-316.
- Porto, M. S., Pinheiro, M. P. N., Batista, V. G. L., dos Santos, R. C., de Albuquerque Melo Filho, P., & de Lima, L. M. (2014). Plant promoters: an approach of structure and function. *Molecular biotechnology*, 56(1), 38-49.
- Priest, H. D., Filichkin, S. A., & Mockler, T. C. (2009). Cis-regulatory elements in plant cell signaling. *Current opinion in plant biology*, 12(5), 643-649.
- Prochnik, S., Marri, P. R., Desany, B., Rabinowicz, P. D., Kodira, C., Mohiuddin, M., Rounsley, S. (2012). The Cassava Genome: Current Progress, Future Directions. *Tropical Plant Biology*, 5(1), 88–94. <http://doi.org/10.1007/s12042-011-9088-z>.
- Qi, T., Huang, H., Wu, D., Yan, J., Qi, Y., Song, S., & Xie, D. (2014). Arabidopsis DELLA and JAZ proteins bind the WD-repeat/bHLH/MYB complex to modulate gibberellin and jasmonate signaling synergy. *The Plant Cell*, tpc-113.
- Ramírez N, Jiménez, LM, Ramírez PA, Jiménez PA. 2010. El cultivo de la yuca *Manihot esculenta* Crantz; para producción forrajera y su utilización en la alimentación de bovinos: manual técnico (No. Doc. 23045) CO-BAC, Bogotá).
- Ratlamwala, H. (2014). Two spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) selection to *Arabidopsis thaliana*.
- Reymond P., H. Weber, M. Damond y E.E Farmer. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12:707-19.
- Rêgo, A. S., Teodoro, A. V., Maciel, A. G., & Sarmiento, R. A. (2013). Relative contribution of biotic and abiotic factors to the population density of the cassava green mite, *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae). *Experimental and applied acarology*, 60(4), 479-484.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C. Z., Keddie, J., ... & Creelman, R. (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290(5499), 2105-2110.

- Rohwer, C. and Erwin, J. 2010. Spider mites (*Tetranychus urticae*) perform poorly on and disperse from plants exposed to methyl jasmonate. *Entomol. Exp. Appl.* 1:1-10.
- Rojo E, Solano R, Sanchez JJ. 2003. Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *Journal of Plant Growth Regulation.* 22:82-98.
- Sanders PM, Lee PY, Biesgen C, Boone JD, Beals TP, Weiler EW, and Goldberg RB (2000) The arabidopsis DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell* 12:1041-1061.
- Sazegari, S., Niazi, A., & Ahmadi, F. S. (2015). A study on the regulatory network with promoter analysis for Arabidopsis DREB-genes. *Bioinformation*, 11(2), 101.
- Scalschi, L., Sanmartín, M., Camañes, G., Troncho, P., Sánchez-Serrano, J. J., García-Agustín, P., & Vicedo, B. (2015). Silencing of OPR3 in tomato reveals the role of OPDA in callose deposition during the activation of defense responses against *Botrytis cinerea*. *The Plant Journal*, 81(2), 304-315.
- Schneider, C. A.; Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012), "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis", *Nature methods* 9(7): 671-675, PMID 22930834.
- Shim, J. S., Jung, C., Lee, S., Min, K., Lee, Y. W., Choi, Y., & Choi, Y. D. (2013). A MYB44 regulates WRKY70 expression and modulates antagonistic interaction between salicylic acid and jasmonic acid signaling. *The Plant Journal*, 73(3), 483-495.
- Sghaier, N., Ayed, R. B., Gorai, M., & Rebai, A. (2018). Prediction of auxin response elements based on data fusion in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology Reports*, 1-10.
- Song, S., Xu, Y., Huang, D., Miao, H., Liu, J., Jia, C., ... & Jin, Z. (2018). Identification of a novel promoter from banana aquaporin family gene (MaTIP1; 2) which responds to drought and salt-stress in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 163-169.
- Soto M, Restrepo S, Mosquera G, Verdier V, Tohme J. 2006. Análisis de expresión génica durante la respuesta de defensa de la yuca a la bacteriosis vascular (Añublo Bacteriano). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 8(2), 16.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Metraux JP, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong XN, and Pieterse CMJ (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15:760-770.
- Schoonhoven, L.M., Van Loon, J.J.A., Dicke, M. 2005. *Insect–plant biology*. Oxford: Oxford University Press.

- Staswick, P.E., Su, W., Howell, S.H. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992, 89, 6837-6840.
- Strassner J, Schaller F, Frick UB, Howe GA, Weiler EW, Amrhein N, Macheroux P, and Schaller A (2002) Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *Plant J* 32:585-601
- Steffens, N. O., Galuschka, C., Schindler, M., BuÈlow, L., & Hehl, R. (2004). AthaMap: an online resource for in silico transcription factor binding sites in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nucleic acids research*, 32(suppl_1), D368-D372.
- Stupak, M., Vanderschuren, H., Gruissem, W., Zhang, P. 2006. Biotechnological approaches to cassava protein improvement. *Trends in Food Science & Technology*. 17(12): 634-641.
- Strucker, A., da Silva Bandeira, H. F., Lima, A. C. S., Alves, J. M. A., & Trassato, L. B. (2017). Preferência alimentar e de oviposição do ácaro-verde (Acari: Tetranychidae) em diferentes genótipos de mandioca em Roraima. *REVISTA AGRO@ MBIENTE ON-LINE*, 11(3), 248-257.
- Su, Q., Oliver, K. M., Xie, W., Wu, Q., Wang, S., & Zhang, Y. (2015). The whitefly-associated facultative symbiont *Hamiltonella defensa* suppresses induced plant defences in tomato. *Functional Ecology*, 29(8), 1007-1018.
- Suárez L, Mederos V. 2011. Apuntes sobre el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Tendencias actuales. Cultivos Tropicales*, 32(3), 27-35.
- Thaler, J.; Stout, M.; Karban, R. and Duffey, S. 2001. Jasmonate-mediated induced plants resistance affects a community of herbivores. *Ecol. Entomol.* 26:312-324.
- Taurino, M. (2012). Modificación genética de la biosíntesis del ácido jasmónico y efecto en la respuesta de defensa en patata.
- Toyoda, K., Kawanishi, Y., Kawamoto, Y., Kurihara, C., Yamagishi, N., Tamura, A. & Shiraishi, T. (2013). Suppression of mRNAs for lipoxygenase (LOX), allene oxide synthase (AOS), allene oxide cyclase (AOC) and 12-oxo-phytodienoic acid reductase (OPR) in pea reduces sensitivity to the phytotoxin coronatine and disease development by *Mycosphaerella pinodes*. *Journal of general plant pathology*, 79(5), 321-334.
- Trujillo, H. E., Arias, B., Guerrero, J. M., Hernández, P., Bellotti, A. C., and Peña, J. E. 2004. Survey of parasitoids of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) in cassava growing regions of Colombia and Ecuador. *Florida Entomologist* 87, 268-273.
- Tsakarakou A, Nikou D, Roditakis E, Sharvit M, Morin S, Vontas J. 2009. Molecular diagnostics for detecting pyrethroid and organophosphate resistance mutations in the

- Q biotype of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 94(2009)49– 54.
- Turner JG, Ellis C, Devoto A. 2002 The jasmonate signal pathway. *Plant Cell.* 14, S153 - 164.
- Ueda, M., K. Nishi, 2006. Contribution of jasmonic acid to resistance against *Phytophthora* blight in *Capsicum annuum* cv. SCM334. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67: 149-154.
- Umate P (2011) Genome-wide analysis of lipoxygenase gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Signal Behav* 6:335-338.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0034.
- Vásquez-Ordóñez, A. A., & Parsa, S. (2014). A geographic distribution database of *Mononychellus* mites (Acari, Tetranychidae) on cassava (*Manihot esculenta*). *ZooKeys*, (407), 1.
- Walangululu, M., Lema, K. M., & Nsumbu, N. (1998). Mechanisms of resistance to the cassava green mite *Mononychellus tanajoa* (Bondar) on pubescent and non-pubescent cassava varieties. *International Journal of Tropical Insect Science*, 18(4), 285-291.
- Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of botany*, 111(6), 1021-1058.
- Wilens, R.W., vanRooijen, G.J., Pearce, D.W., Pharis, R.P., Holbrook, I.A., Moloney, M.M. Effects of jasmonic acid on embryo specific processes in *Brassica* and *Linum* oilseeds. *Plant Physiol.* 1991, 95, 399-405.
- Xin, S., Tao, C., & Li, H. (2016). Cloning and functional analysis of the promoter of an ascorbate oxidase gene from *Gossypium hirsutum*. *PloS one*, 11(9), e0161695.
- Yan, Y., Borrego, E., & Kolomiets, M. V. (2013). Jasmonate biosynthesis, perception and function in plant development and stress responses. In *Lipid metabolism*. InTech.
- Yang F, Zhang Y, Huang Q, Yin G, Pennerman KK, Yu J, Guo A. 2015. Analysis of key genes of jasmonic acid mediated signal pathway for defense against insect damages by comparative transcriptome sequencing. *Scientific reports*, 5.
- Zavala JA. 2010. Respuestas inmunológicas de las plantas frente al ataque de insectos. *Ciencia hoy*, 20(117), 52-59.

- Zhang J, Simmons C, Yalpani N, Crane V, Wilkinson H, and Kolomiets M (2005) Genomic analysis of the 12-oxo-phytodienoic acid reductase gene family of *Zea mays*. *Plant Mol Biol* 59:323-343.
- Zhang, X.; Sheng, J.; Li, F.; Menga, D. e Shen, L. (2012) - Methyl jasmonate alters arginine catabolism and improves postharvest chilling tolerance in cherry tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, vol. 64, n. 1, p. 160–16.
- Zhang, P. J., Broekgaarden, C., Zheng, S. J., Snoeren, T. A., van Loon, J. J., Gols, R., & Dicke, M. (2013). Jasmonate and ethylene signaling mediate whitefly-induced interference with indirect plant defense in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 197(4), 1291-1299.
- Zhang, P. J., Li, W. D., Huang, F., Zhang, J. M., Xu, F. C., & Lu, Y. B. (2013). Feeding by whiteflies suppresses downstream jasmonic acid signaling by eliciting salicylic acid signaling. *Journal of chemical ecology*, 39(5), 612-619.
- Zhang, P. J., Xu, C. X., Zhang, J. M., Lu, Y. B., Wei, J. N., Liu, Y. Q., & Turlings, T. C. (2013). Phloem-feeding whiteflies can fool their host plants, but not their parasitoids. *Functional ecology*, 27(6), 1304-1312.

Capítulo 2. Artículo científico

Revista Orinoquía

Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana

ISSN: 0121-3709 (impresa)

ISSN(E): 2011-2629

Evaluación de cinco genes relacionados con la vía del ácido jasmónico durante el ataque de dos plagas en yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

Evaluation of five genes related to the jasmonic acid pathway during the attack of two pests in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)

Avaliação de cinco genes relacionados à via do ácido jasmônico durante o ataque de duas pragas na mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)

Wilmer Vargas-Agudelo¹; Jaime A Marín²

¹ Biólogo, PhD, estudiante, Facultad de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad de los Llanos

² Biólogo, PhD Centro de recursos genéticos, Facultad de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad de los Llanos Llanos, Villavicencio, Colombia.

Email: jmarin@unillanos.edu.co

Resumen

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es una fuente esencial de carbohidratos para alrededor de 500 millones de personas en países tropicales subdesarrollados. Varias plagas afectan directamente este cultivo, la mosca blanca y el ácaro verde son las principales. Los ácaros llegan a reducir el rendimiento de raíces frescas en cultivares susceptibles en un 21, 25 y 53% durante un ataque de 3, 4 y 6 meses, respectivamente, y en un 15% en los cultivares resistentes. La mosca blanca se alimenta del floema, produce clorosis y caída de hojas, afectando el rendimiento de la producción de la raíz. Los mecanismos de defensa, en este caso la vía de señalización del ácido jasmónico (AJ) y los genes involucrados en la respuesta han sido pobremente estudiados en yuca. Estudiar estos genes mediante análisis de expresión es de gran importancia para entender dichos mecanismos. Los objetivos del presente trabajo es evaluar la expresión de genes relacionados con la vía de señalización del ácido jasmónico frente al ataque de dos artrópodos plaga en yuca y establecer la preferencia de *Aleurotrachelus socialis* y *Mononychellus tanajoa* ante la yuca, evaluando el efecto de la oviposición sobre esta. Se realizaron ensayos a

libre y a no libre escogencia con la finalidad de determinar la preferencia de oviposición de los artrópodos plaga. Se obtuvo que en el ensayo a no libre escogencia el genotipo CMC 40 es más susceptible a la oviposición del ácaro verde y que Ecu 72 presentaba menor oviposición a través del tiempo, entre 2 y 3 huevos menos en promedio. Entre tanto, el ensayo a libre escogencia concluyó que la oviposición era diferente en los dos genotipos, presentando Ecu 72 menor oviposición a través del tiempo. Se realizó un análisis molecular con los niveles de expresión y PCR semi cuantitativo. El análisis de la expresión de los genes mostró que hay una regulación positiva para cuatro de los cinco genes evaluados tanto en el ataque del ácaro verde como de la mosca blanca. El gen G3PDH no se expresa establemente y por lo tanto es aconsejable no usarlo como control interno. Se logró comprender parcialmente los mecanismos subyacentes de las respuestas de la yuca a dos plagas lo cual permitirá desarrollar estrategias de protección de cultivos en un contexto de múltiples atacantes. Además, los resultados obtenidos de la expresión diferencial de genes relacionados con la vía del ácido jasmonico podrían proporcionar recursos muy valiosos en programas de mejoramiento molecular de yucas resistentes a enfermedades y artrópodos plaga.

Palabras clave: *ácaro verde, ácido jasmónico, estrés biótico, mosca blanca, respuesta de defensa.*

Abstrac

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an essential source of carbohydrates for around 500 million people in third world tropical countries. Several pests affect this crop directly, the whitefly and the green mite are the most relevant ones. Mites can reduce the yield of fresh roots in susceptible cultivars by 21, 25 and 53% during an attack of 3, 4 and 6 months, respectively, and by 15% in resistant cultivars. The whitefly feeds on the phloem, produces chlorosis and leaf fall, affecting the yield of root production. The defense mechanisms, in this case, the signaling pathway of jasmonic acid (AJ) and the genes involved in the response have been poorly studied in cassava. Studying these genes through expression analysis is of great importance to understand these mechanisms. The aim of the present work is to evaluate the expression of genes related to the signaling pathway of jasmonic acid against the attack of two plague arthropods, and establish the preference of *Aleurotrachelus socialis* and *Mononychellus tanajoa* in cassava, by evaluating the effect of oviposition on this. Free and non-free choice trials were carried out in order to determine the oviposition preference of the pest arthropods. It was found that in the non-free-choice trial, the CMC 40 genotype was more susceptible to the oviposition of the green mite and the Ecu 72 had less oviposition over time, between 2 and 3 eggs less on average. Meanwhile, the free-choice trial concluded that oviposition was different in the two genotypes, with Ecu 72 exhibiting less oviposition over time.

A molecular analysis was performed with the expression levels and semi-quantitative PCR. The analysis of the expression of the genes showed that there is a positive regulation for four of the five genes evaluated both in the attack of the green mite and the whitefly. The G3PDH gene is not expressed stably and therefore it is advisable not to use it as an internal control. The underlying mechanisms of cassava responses to two pests were partially understood, which will allow the development of crop protection strategies in a context of multiple attackers. In addition, the results obtained from the differential expression of genes related to the jasmonic acid pathway could provide very valuable resources in programs for the molecular improvement of resistant cassava to diseases and pest arthropods.

Keywords: *green mite, jasmonic acid, biotic stress, whitefly, defense response.*

Resumo

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma fonte essencial de carboidratos para cerca de 500 milhões de pessoas em países tropicais subdesenvolvidos. Várias pragas afetam diretamente esta cultura, a mosca branca e o ácaro verde são os principais. Ácaros vir a reduzir a produção de raízes frescas em cultivares sensíveis aos 21, 25 e 53% durante um ataque de 3, 4 e 6 meses, respectivamente, e por 15% em cultivares resistentes. A mosca branca se alimenta do floema, produz clorose e queda de folhas, afetando o rendimento da produção de raízes. Os mecanismos de defesa, neste caso, a via de sinalização do ácido jasmônico (AJ) e genes envolvidos na resposta foram pouco estudadas em mandioca. Estudar esses genes através da análise de expressão é de grande importância para entender esses mecanismos. Os objetivos deste estudo é avaliar a expressão do ácido jasmônico via de sinalização relacionada do ataque de pragas de artrópodes em dois mandioca e estabelecer preferência *Aleurotrachelus socialis* e *Mononychellus tanajoa* a genes de mandioca, avaliando o efeito de oviposição sobre este aqui Testes de escolha livre e não livre foram realizados para determinar a preferência de oviposição dos artrópodes-praga. Foi obtido no teste de escolha não genótipo livre CMC 40 é mais susceptível de ácaros oviposição verde e tinha menos oviposição 72 ECU ao longo do tempo, entre 2 e 3 ovos, em média, menos. Enquanto isso, o estudo de livre escolha concluiu que a oviposição era diferente nos dois genótipos, com Ecu 72 exibindo menor oviposição ao longo do tempo. A análise molecular foi realizada com os níveis de expressão e PCR semiquantitativo. A análise da expressão dos genes mostrou que há uma regulação positiva para quatro dos cinco genes avaliados tanto no ataque do ácaro verde quanto na mosca branca. O gene G3PDH não é expresso de forma estável e, portanto, é aconselhável não utilizá-lo como controle interno. Os mecanismos subjacentes das respostas da mandioca a duas pragas foram parcialmente compreendidos, o que permitirá o desenvolvimento de estratégias de proteção de culturas em um contexto de

múltiplos atacantes. Além disso, os resultados de expressão diferencial do ácido jasmônico via relacionada poderia fornecer programas de recursos valiosos Molecular Breeding resistentes a doenças genes Yucas pragas de artrópodes.

Palavras chave: ácaro verde, ácido jasmônico, estresse biótico, mosca branca, resposta de defesa.

INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es esencial en la dieta y una de las fuentes más importantes de calorías para alrededor de 750 millones de personas en países tropicales en vías de desarrollo (Nhassico *et al.*, 2008; Stupak *et al.*, 2006; Hasibuan y Nazir, 2017). Además de su importancia como alimento, también se utiliza en la industria de productos procesados, alimento para animales, etanol y almidón (Jansson *et al.*, 2009; Ceballos *et al.*, 2006). Cultivada en aproximadamente 180 países, cerca de 53,6 millones de hectáreas cultivadas y una respectiva producción de 752,6 millones de toneladas. No obstante este cultivo se ve afectado por alrededor de 200 especies de artrópodos que atacan este cultivo, entre estas el ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) y la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*) (Bellotti *et al.*, 2012).

En la mayoría de las regiones productoras, el ácaro verde (*M. tanajoa*), es el responsable del daño durante la época seca y por lo tanto produce graves pérdidas económicas, al disminuir la calidad y producción en el cultivo (Ramírez *et al.*, 2010; Bellotti, 2002). Los daños del ácaro se

caracterizan por generar punteados amarillentos que se extienden en el tejido y dan un aspecto moteado y bronceado (característico del mosaico), las hojas se desarrollan con malformaciones; cuando el ataque es extenso el área foliar se reduce en una alta proporción; el tallo adquiere un aspecto áspero y marrón, finalmente, la parte superior de la planta toma forma como de lanceta (Ramírez *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2002). Ensayos experimentales en Colombia han mostrado que los ácaros llegan a reducir el rendimiento de raíces frescas en cultivares susceptibles en un 21, 25 y 53% durante un ataque de 3, 4 y 6 meses, respectivamente, y en un 15% en los cultivares resistentes (Bellotti, 2008; Bellotti *et al.*, 1999; Herren y Neuenschwander, 1991).

La mosca blanca (*A. socialis*) es una plaga que causa daños importantes en el cultivo de la yuca en América, África y Asia ya sea alimentándose directamente o siendo vector de graves enfermedades (CMD, CBSD). En el neotrópico se han registrado 11 especies que conforman un gran complejo; *Aleurotrachelus socialis* es la más importante con una distribución amplia en el norte de América del Sur: Colombia, Ecuador y Venezuela (Bellotti *et al.*, 2005; Trujillo *et al.*,

2004). Los daños causados por el ataque de *A. socialis* tienen una importancia económica en Colombia, basada en el rendimiento de las raíces y la disponibilidad de estacas para la siembra. La mosca blanca se alimenta del floema de las hojas, produce clorosis y caída de las mismas, afectando el rendimiento en la producción de raíces si el ataque se mantiene. Bellotti y colegas reportaron en el 2012 una correlación entre la duración del ataque de *A. socialis* y las pérdidas en la producción de raíces, a saber, infestaciones de 1, 6 y 11 meses, pueden reducir el rendimiento en 5, 42 y 79%, respectivamente.

El ácido jasmónico es considerado una fitohormona que actúa como una molécula de señalización en las plantas frente a daños causados por herbívoros y patógenos (Deuner *et al.*, 2015; Wasternack y Hause, 2013). También, actúan en la señalización de las interacciones entre las plantas y microorganismos beneficiosos ligados a la raíz (Pieterse *et al.*, 2009). De igual forma, regula la apertura estomática, la inhibición del crecimiento de la raíz, la maduración del fruto, la germinación de las semillas, el enrollamiento del zarcillo, la senescencia y las respuestas de la planta ante las heridas (Bari y Jones, 2009). Además, los genes LOX2, AOS, OPR2, CEV1 y MYC2 actúan directamente sobre esta vía de señalización, permitiendo y/o inhibiendo la síntesis del ácido jasmónico (Yan *et al.*, 2013). Por lo tanto, sumado a las problemáticas

antes mencionadas, la falta de información relacionada con los mecanismos de defensa de esta planta, como la vía de señalización del ácido jasmónico en yuca, aún se desconoce, ignorando la dinámica de la expresión génica que interviene en esta vía de señalización y por consiguiente no permite trazar objetivos más audaces que conlleven a comprender mejor las causas y respuestas de esta vía para posteriormente ser aplicadas a este cultivo de alto valor económico. En función de lo dicho anteriormente, la pregunta de investigación que se quiere responder es; ¿Cómo es la expresión génica de los genes LOX2, AOS, OPR2, CEV1 y MYC2 asociados a la vía de señalización del ácido jasmónico frente al ataque del ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) y la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*) en yuca (*Manihot esculenta* Crantz)?

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis Fenotípico

Sitio de trabajo y material vegetal

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular adscrito al Centro de Recursos Genéticos de la Orinoquia Colombiana (CRGOC) y en el laboratorio de Biotecnología, ubicados en la Universidad de los Llanos-campus Barcelona. Se trabajó con dos genotipos de yuca, CMC 40 y Ecu 72, los cuales presentan respuestas contrastantes frente al ataque del ácaro verde y la mosca blanca; CMC

40 siendo susceptible y Ecu 72 resistente. Cerca de 30 plántulas fueron propagadas y dejadas en un cuarto de crecimiento con una temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $70 \pm 5\%$ RH y 12 horas de fotoperiodo, durante tres meses. Luego, estas plantas se trasplantaron a bolsas con suelo esterilizado, en relación 2:1 de abono y tierra, y ubicadas en el invernadero para su aclimatación, posteriormente fueron llevadas al laboratorio de biología molecular para llevar a cabo la evaluación fenotípica y el análisis molecular de la infestación.

Colecta de artrópodos plaga

Los artrópodos plaga se colectaron en cultivos de yuca ubicados en los municipios de Acacías, San Martín de los Llanos, El Castillo, El dorado y San Luis de Cubarral. Durante tres días por municipio se visitaron diferentes veredas y fincas para obtener el mayor número de artrópodos plaga (Tabla 1). Los ácaros verdes se colectaron al cortar hojas con presencia del artrópodo y posteriormente se llevaron al laboratorio de biología molecular para infestar plantas del genotipo CMC 40 y así establecer una colonia. La colecta de la mosca blanca se realizó gracias a aspiradores entomológicos manuales, los cuales atrapaban las moscas y las depositaba en un frasco con hojas de yuca para posteriormente establecer

la colonia en genotipos susceptibles. La crianza de los artrópodos plaga se realizó bajo condiciones controladas ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 5\%$ HR y 12 h de fotoperiodo) en el laboratorio de biología molecular y biología de la universidad de los Llanos.

Ensayos a libre y a no libre escogencia

Los ensayos a libre y a no libre escogencia se realizaron con el propósito de evaluar la parte fenotípica de este trabajo, estableciendo la preferencia de los artrópodos plaga ante la yuca con el efecto de la oviposición (Mesa et al., 1987; Marín, 2015).

Ácaro verde (*M. tanajoa*)

El ensayo a libre escogencia se hizo tomando cinco lóbulos de cada genotipo (10 en total), se acomodaron en cajas de Petri (150mm X 15mm) y sobre una espuma humedecida con agua, estos se distribuyeron alrededor en círculo y de forma. En el centro de cada caja de Petri se ubicó un lóbulo infestado con alrededor de 20 ácaros. En este bioensayo se trabajó con 6 cajas de Petri para un total de 30 repeticiones por genotipo (30 lóbulos). Con respecto al ensayo a no libre escogencia, se ubicó el mismo genotipo en una sola caja de Petri, es decir, 10 lóbulos del genotipo susceptible (CMC 40) en una caja de Petri y 10 lóbulos del genotipo

Tabla 1. Sitios de colecta de artrópodos plaga en los municipios de Acacías, San Martín de los Llanos, Cubarral, Castillo y El Dorado.

Departamento	Municipio	Localidad	Latitud decimal	Longitud decimal	Elevación (m)
Meta	Acacías	Vereda Sardinata	04°00'55,3"	73°43'53,5"	515
Meta	Acacías	Vereda El Rosario, Finca El Recuerdo	04°01'15,2"	73°42'33,0"	502
Meta	Acacías	Vereda Margarita, Finca El Triunfo	04°01'14,6"	73°42'31,2"	510
Meta	San Martín de los Llanos	San Cayetano	03°45'30,6"	73°43'29,6"	467
Meta	San Martín de los Llanos	Vereda Llano Grande	03°41'58,8"	73°40'36,6"	410
Meta	San Luis de Cubarral	Vereda Puerto Ariari	03°47'22,2"	73°50'37,9"	591
Meta	El Dorado	Centro poblado San Isidro del Ariari	03°44'51,2"	73°49'52,4"	524
Meta	El Dorado	Centro poblado Pueblo Sánchez	03°40'59,1"	73°47'48,6"	435
Meta	El Castillo	Corregimiento Medellín del Ariari, Vereda Caño Tigre	03°37'57,4"	73°48'16,4"	401
Meta	El Castillo	Corregimiento Medellín del Ariari, Vereda Caño Tigre	03°37'24,7"	73°48'08,6"	395
Meta	San Luis de Cubarral	Vereda Marayal, Finca La Reserva	03°47'29,2"	73°47'06,5"	507
Meta	San Luis de Cubarral	Vereda Puerto Ariari	03°47'22,2"	73°50'37,9"	591
Meta	El Castillo	Vereda Playa Rica	03°36'14"	73°47'49,4"	382
Meta	El Castillo	Vereda Caño Brasil, a 1.3 Km de la Vereda La Floresta	03°34'57,3"	73°37'47,4"	369
Meta	El Castillo	Corregimiento Medellín del Ariari, Vereda Caño Tigre	03°37'24,7"	73°48'08,6"	395
Meta	El Castillo	Vereda Caño Brasil, a 1.3 Km de la Vereda La Floresta	03°34'57,3"	73°37'47,4"	369
Meta	El Dorado	Vereda Santa Rosa Baja, Escuela	03°45'42,1"	73°50'44,5"	546
Meta	El Dorado	Centro poblado San Isidro del Ariari	03°44'51,2"	73°49'52,4"	524
Meta	El Dorado	Centro poblado San Isidro del Ariari	03°42'54,0"	73°48'31,7"	472
Meta	El Dorado	Centro poblado San Isidro del Ariari	03°42'16,03"	73°48'14,68"	461

resistente (Ecu 72) en otra caja de Petri. En este bioensayo se emplearon 6 cajas de Petri para un total de 30 repeticiones por genotipo. La ubicación de los ácaros fue la misma que en el ensayo a libre escogencia. Para los dos tipos de ensayo se contó el número de huevos puestos por la hembra en función de su preferencia dos veces por día durante 5 días.

Análisis estadístico El análisis estadístico de la oviposición se realizó mediante un gráfico de cajas y bigotes para observar la distribución de los datos. Debido a que los datos no presentaban una distribución homogénea, se decidió hacer una prueba de rangos de Wilcoxon con la ayuda del programa R, el cual compara el rango medio de dos muestras relacionadas y determina si las diferencias entre estas se deben a eventos del azar o no. Con base en lo anterior se trabajó con dos hipótesis:

H0: La variable ovoposición tiene la misma distribución en los dos genotipos (las medianas son iguales).

H1: En una población, la ovoposición tiende a dar valores mayores que en la otra (Las medianas son diferentes).

Análisis molecular de la interacción planta-artrópodo

Diseño de primers y PCR

Los ortólogos en yuca de los genes de *Arabidopsis thaliana* se identificaron gracias a la herramienta BLAST de phytozome

(<http://www.phytozome.net/>). Las secuencias de yuca obtenidas se usaron como plantillas para el diseño de primers utilizando el software primer3plus y Primer designing tool de NCBI (Tabla 2). La especificidad de los pares de cebadores fue confirmada por BLASTN con todas las secuencias de *Manihot esculenta* disponibles en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Los primers se analizaron con la ayuda del software NetPrimer (<https://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) para predecir la óptima temperatura de alineamiento, analizar las propiedades del cebador, evitar estructuras secundarias como horquillas, dímeros, dímeros cruzados, palíndromos y repeticiones, y predecir cuantitativamente la eficacia del oligo.

Extracción de DNA y RNA

La extracción de DNA y RNA se realizó mediante 100mg de material vegetal de cada uno de los tiempos evaluados, utilizando el kit Invisorb® Spin Plant Mini Kit y el kit InviTrap Spin Plant RNA Mini Kit, respectivamente, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Se realizó una repetición biológica y tres repeticiones técnicas.

Gel de calidad y cuantificación

El gel de calidad del DNA y RNA se hizo al 1,2% de agarosa, con una corrida de 100 voltios por 40 minutos en una cámara de electroforesis

Tabla 2. Genes de trabajo y sus secuencias de primers usados para el análisis molecular.

Nombre de gen	N° accesión	Descripción gen	Secuencia de primers	Amplicón
UBQ10	Manes.07G019300.1	Ubiquitina 10	Fwd TCCACCTTGCATCTCGTTCT	196pb
			Rev TTCCGTCCTCTAGCTGCTTC	
G3PDH	Manes.15G156700.1	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Fwd CACTGTCCACTCCATTACCG	180pb
			Rev CAGCTCTTCCACCTCTCCAG	
CEV1	AT5G05170	Celulosa sintasa	Fwd GGTATGGCTACGGTGAAGA	500pb
			Rev GCAAGGACTTTCAGCAGACC	
MYC2	AT1G32640	Factor de transcripción MYC2	Fwd CTCTGATCTCGCCGCTCTTT	330pb
			Rev ACCTTCTTTCGGTGCTCTG	
LOX2	AT3G45140	Lipoxigenasa 2	Fwd TGCCAACAGAAGAGCCAACA	360pb
			Rev GAACTCCCTTCCCTGTGACC	
AOS	AT5G42650	Aleno oxido sintasa	Fwd AACCCACCATCCACACCTT	313pb
			Rev TCCAGAGAAGCCATCGTGA	
OPR2	AT1G76690	Ácido oxiconododienoico reductasa	Fwd TGGCCCCTCGACTTAAAGC	745pb
			Rev TCCCCCGTATTCGTCTGTTC	

horizontal y una visualización en un transiluminador E-Gel Imager. La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó gracias al espectrofotómetro Cytation 3, Cell Imaging Multi-Mode Reader de BioTek, del laboratorio del grupo biotox de la universidad de los llanos, este equipo cuenta con una placa de 16 pozos, con la capacidad de analizar muestras por duplicado y por consiguiente obtener una cuantificación exacta.

Síntesis de cDNA

Previo a la síntesis de cDNA se realizó una digestión de DNA con el kit DNase I en las muestras de RNA, para evitar contaminación y errores en el análisis molecular. Se trabajó con una

concentración de 1000ng de RNA, adicionando 1ul de buffer 10x, 1ul de DNase I y completándose a 10ul con agua libre de nucleasas, la mezcla de reacción se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, posterior a eso se agregó 2 ul de EDTA 25 mM y se calentó a 65°C por diez minutos.

La síntesis de cDNA se realizó utilizando el kit ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis y siguiendo las especificaciones del fabricante.

Amplificación de los cinco genes

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de los 5 genes a evaluar más los candidatos a genes de referencia se realizó en un

termociclador Labnet Multigene Optimax con el siguiente programa de amplificación: desnaturalización a 95 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, con una temperatura de anillamiento variable en función del gen amplificado durante 30 segundos, a 72 °C durante 30 segundos y una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. El producto de amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 2%. Se utilizó un marcador de peso de 100pb y 50pb para indicar el peso de la banda amplificada. Para la estandarización del PCR de los diferentes genes se realizó como primer paso un touchdown con una temperatura de anillamiento variable de +0,4 por cada ciclo (a 25 ciclos) para verificar que los primers estaban bien diseñados y por lo tanto comprobar la especificidad de la amplificación. Una vez comprobada la efectividad de los primers, se realizó una amplificación con un gradiente de temperatura para determinar la temperatura óptima de anillamiento y por consiguiente, obtener una banda más clara.

Resultados y discusión

Oviposición *Mononychellus tanajoa*

No libre escogencia

El gráfico de caja y bigotes muestra que en los primeros seis tiempos el genotipo CMC40 (rojo) presenta los máximos valores. A partir del séptimo

tiempo el comportamiento es muy similar entre los dos genotipos. Se observa ausencia de homocedasticidad (Figura 1). Al realizar un contraste para la comparación de los grupos no fue posible aplicar un análisis de comparación de medias, debido a la falta de homogeneidad de los datos, por ello se decidió aplicar la prueba de rangos de Wilcoxon, en la cual las hipótesis de prueba que se manejan son:

H0: La variable ovoposición tiene la misma distribución en los dos genotipos (las medianas son iguales).

H1: En una población, la ovoposición tiende a dar valores mayores que en la otra (Las medianas son diferentes).

Los resultados de la prueba de Wilcoxon arrojó un valor de p menor a $2.245e-14$, al nivel de significancia de 5%, se rechaza la hipótesis nula, por consiguiente se puede decir que la ovoposición es diferente en los genotipos evaluados. Las curvas de oviposición (Figura 2) presentan patrones bastante diferenciados en los genotipos. En el caso del genotipo ECU72 la ovoposición día a día es casi nula. En el genotipo CM40 el segundo tiempo es el de máxima ovoposición, desciende en el tercero, con un leve repunte en el cuarto tiempo, para luego descender casi a cero en el noveno tiempo. Se observa en todo momento que el genotipo CM40 presenta valores más altos de ovoposición.

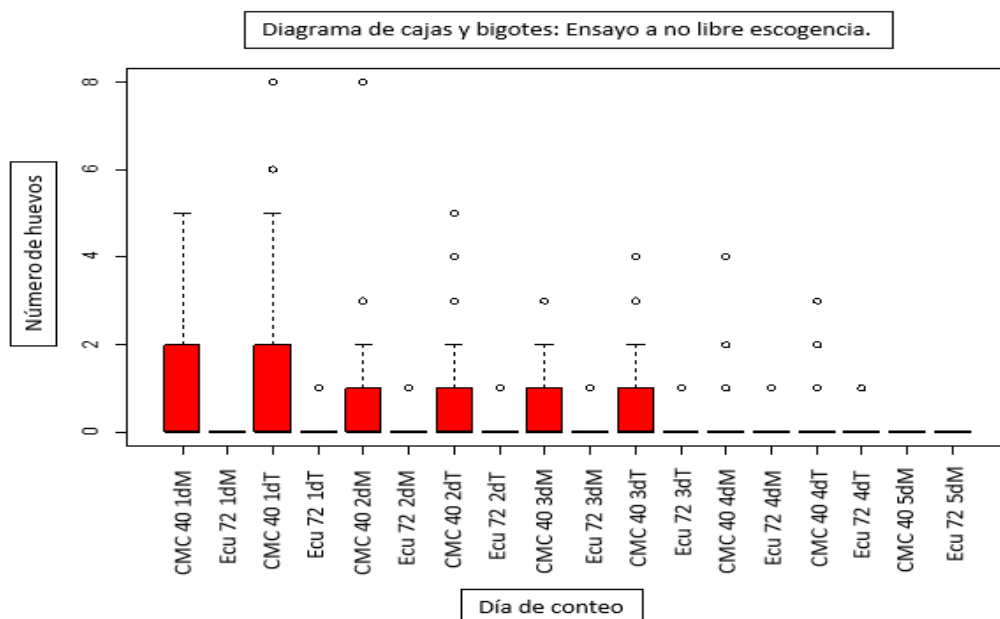


Figura 1. Modelo de cajas y bigotes, número de huevos según genotipo y día, bioensayo a no libre escogencia. 1dM: Día uno en la mañana; 1dT: Día uno en la tarde; 2dM: Día dos en la mañana; 2dT: Día dos en la tarde; 3dM: Día tres en la mañana; 3dT: Día tres en la tarde; 4dM: Día cuatro en la mañana; 4dT: Día cuatro en la tarde; 5dM: Día cinco en la mañana; 5dT: Día cinco en la tarde.

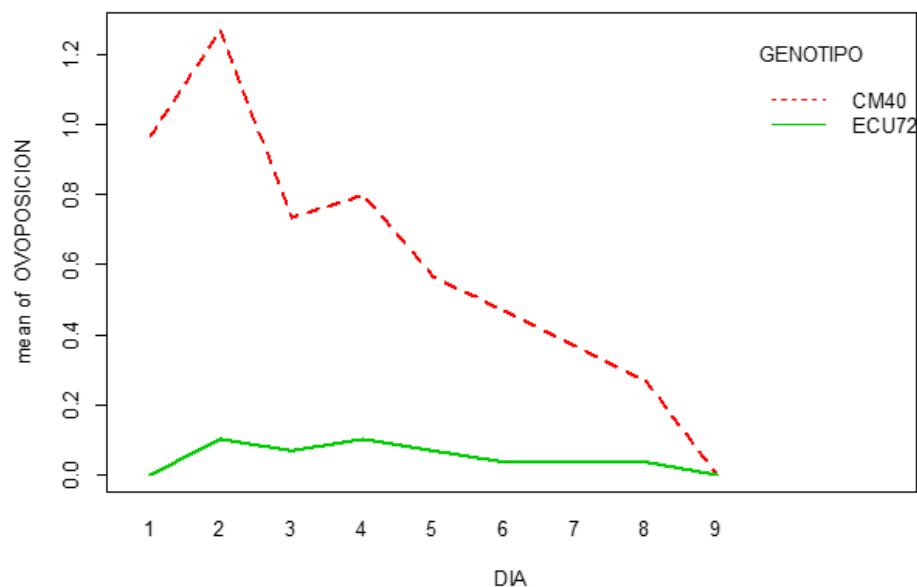


Figura 2. Curva de oviposición de los dos genotipos CMC 40 y Ecu 72, bioensayo a no libre.

Bioensayo a libre escogencia

El gráfico de caja y bigotes (Figura 3) muestra que en general el genotipo CMC40 (verde) presenta los máximos valores en cada día. Al igual que en el bioensayo a no libre escogencia, se observa ausencia de homocedasticidad. Igualmente, no es posible realizar un contraste para la comparación de medias por la falta de homogeneidad de los datos y por lo tanto se aplica nuevamente la prueba de rangos de Wilcoxon con las mismas hipótesis planteadas en el bioensayo a no libre escogencia. Los resultados de la prueba arrojaron un valor de p menor a $8,172e-08$ al nivel de significancia de 5%, rechazando la hipótesis nula y por tanto se puede asumir que la ovoposición es diferente en los genotipos evaluados.

Las curvas de oviposición (Figura 4) presentan patrones similares en los genotipos, sin embargo, el promedio de huevos puesto en el periodo de observación siempre es superior en el genotipo CM40.

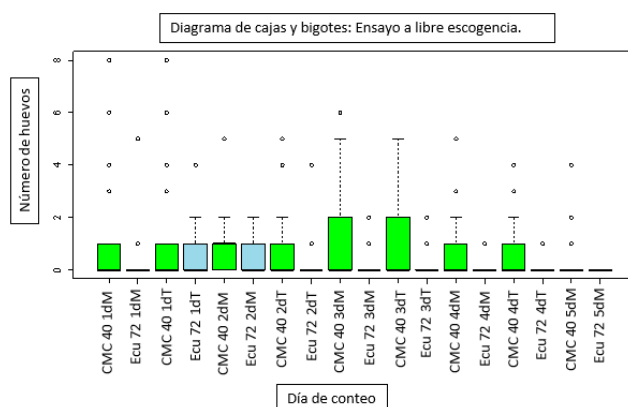


Figura 3. Modelo de cajas y bigotes, número de huevos según genotipo y día, bioensayo a

libre escogencia. 1dM: Día uno en la mañana; 1dT: Día uno en la tarde; 2dM: Día dos en la mañana; 2dT: Día dos en la tarde; 3dM: Día tres en la mañana; 3dT: Día tres en la tarde; 4dM: Día cuatro en la mañana; 4dT: Día cuatro en la tarde; 5dM: Día cinco en la mañana; 5dT: Día cinco en la tarde.

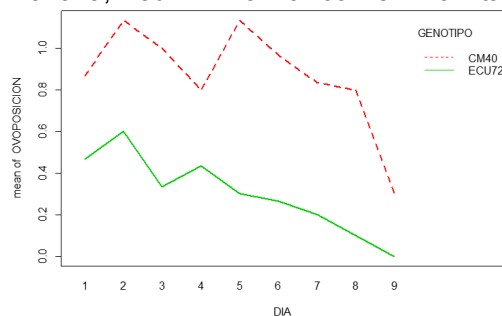


Figura 4. Curva de oviposición de los dos genotipos CMC 40 y Ecu 72, bioensayo a libre escogencia

Análisis de expresión de genes

Interacción entre *Mononichellus tanajoa* y *Manihot esculenta* Crantz

El presente estudio evaluó cualitativamente la expresión de 5 genes relacionados con la vía del ácido jasmonico en dos cultivares de yuca, uno resistente (ECU-72) y otro susceptible (CMC 40) al ataque de artrópodos plaga (ácaro verde y mosca blanca).

El análisis semi cuantitativo de los resultados observados en los gels de agarosa (datos no mostrados), se realizó con ayuda del software ImageJ al realizar un análisis densitométrico de las bandas obtenidas. Los análisis se llevaron a cabo para cada variedad de manera independiente. Los resultados del análisis se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados del análisis semi cuantitativo de la interacción ácaro verde – yuca.

Gen	Ácaro	ECU 72			CMC 40		
	Tiempo	Área	Porcentaje %	D.R	Área	Porcentaje %	D.R
LOX2	0h	22222,610	17,0	1,00	30837,368	23,3	1,00
	6h	24366,024	18,7	1,10	28491,024	21,5	0,92
	24h	27209,731	20,8	1,22	29088,217	22,0	0,94
	4d	26934,731	20,6	1,21	23963,317	18,1	0,78
	8d	29801,489	22,8	1,34	19983,933	15,1	0,65
AOS	0h	6896,075	6,7	1,00	29547,024	24,0	1,00
	6h	11499,681	11,2	1,67	29704,338	24,1	1,01
	24h	25034,702	24,3	3,63	29146,995	23,7	0,99
	4d	29314,167	28,5	4,25	22565,581	18,3	0,76
	8d	30166,974	29,3	4,37	12093,953	9,8	0,41
MYC2	0h	12257,075	11,3	1,00	27139,439	26,1	1,00
	6h	18214,267	16,8	1,49	25427,631	24,4	0,94
	24h	26345,803	24,2	2,15	19618,095	18,8	0,72
	4d	28283,459	26,0	2,31	17498,731	16,8	0,64
	8d	23604,439	21,7	1,93	14414,589	13,8	0,53
OPR2	0h	26846,782	23,3	1,00	17591,246	19,2	1,00
	6h	25853,974	22,4	0,96	13030,317	14,2	0,74
	24h	24511,681	21,3	0,91	24480,388	26,7	1,39
	4d	18405,196	16,0	0,69	20740,217	22,6	1,18
	8d	19614,711	17,0	0,73	16015,539	17,4	0,91
CEV1	0h	8048,903	10,1	1,00	15164,317	18,4	1,00
	6h	12047,752	15,1	1,50	18931,288	23,0	1,25
	24h	16773,459	21,0	2,08	19286,167	23,5	1,27
	4d	20884,752	26,2	2,59	15939,338	19,4	1,05
	8d	22036,317	27,6	2,74	12878,882	15,7	0,85
G3PDH	0h	9816,125	9,9	1,00	26066,368	23,4	1,00
	6h	15138,146	15,2	1,54	16689,974	15,0	0,64
	24h	23313,631	23,4	2,37	27889,095	25,1	1,07
	4d	25445,217	25,5	2,59	22500,146	20,2	0,86
	8d	25935,418	26,0	2,64	18109,418	16,3	0,69
UBQ10	0h	8993,368	14,8	1,00	15177,439	20,5	1,00
	6h	10372,238	17,1	1,15	15741,631	21,3	1,04
	24h	10593,681	17,4	1,18	17081,773	23,1	1,13
	4d	14732,459	24,2	1,64	15385,924	20,8	1,01
	8d	16065,660	26,4	1,79	10578,731	14,3	0,70

La oxigenación del ácido α -linolenico (α -LeA) es el paso inicial para la biosíntesis del AJ. LOX2 se encarga de cumplir esta función (Yan *et al.*, 2013). Según los resultados del análisis semi cuantitativo, las dos variedades activan la vía del ácido jasmónico. Aún así, la dinámica de la expresión es distinta, mientras que en la variedad ECU 72 la expresión aumenta progresivamente desde el tiempo cero horas hasta el día 8, en la variedad CMC 40 disminuye. Esto podría indicar que ECU 72 intensifica sus defensas contra herbívoros a medida que aumenta los ataques de estos, y en CMC 40 disminuye, debido a su susceptibilidad. Una investigación que involucra a *Medicago truncatula* y *Mycosphaerella pinodes*, demostró que el silenciamiento del gen LOX2, reduce la sensibilidad a la fitotoxina coronatina, que se cree que interrumpe las respuestas de defensa del huésped a través de un proceso dependiente de JA (Toyoda *et al.*, 2013). Por tal motivo, se sugiere que LOX2 podría estar asociado a respuestas de defensa de la yuca frente a fitotoxinas. También, recientemente Mochizuki y colegas (2016), encontraron que en *Arabidopsis* el gen LOX2 está involucrado en la síntesis de compuestos volátiles de hojas verdes (VHV; en inglés GLV, green leaf volatiles), por lo tanto, LOX2 es versátil en su función, iniciando la vía del ácido jasmónico y la síntesis de VHV. Además, se encontró que en células intactas la expresión de LOX2

disminuye y se activa rápidamente ante el daño tisular, explicando la alta concentración de VHV en hojas heridas. Con base en lo mencionado anteriormente y los resultados obtenidos, se sugiere que las dos variedades podrían sintetizar VHV como mecanismo de defensa, al emitir dichos compuestos en búsqueda de potenciales enemigos naturales del ácaro, con la diferencia que en ECU 72 la búsqueda se extendería hasta una semana después del inicio de la infestación y en CMC 40 se reduciría (Tabla 3).

Los niveles de transcripción de LOX2 obtenidos concuerdan con los encontrados en un análisis comparativo de los cambios del proteoma inducidos por ácaros *Tetranychus urticae* y aplicación de metil jasmonato en hojas de cítricos. Los altos niveles de lipoxigenasa en hojas de *C. clementina* se obtuvieron en los dos tratamientos (Maserti *et al.*, 2011). Igualmente, Marín (2015) reportó que para la variedad de yuca resistente NAT-31 la proteína LOX2 mostró los siguientes valores: 6 horas 0,722246; 24 horas 1,45062; 4 días 1,735972 y 8 días 1,003678. Se observa una sobrerregulación que aumenta desde el tiempo 6h hasta el día 4 para disminuir considerablemente al día 8. Estos resultados comparados con los obtenidos en este trabajo, sugiere que la dinámica de la expresión de este gen es diferente entre las variedades resistentes y que responden

diferencialmente ante el ataque del ácaro verde, la cuantificación de la expresión por medio de qPCR podría determinar las diferencias. Igualmente, Marin (2015) reportó para una variedad susceptible (60444) los siguientes valores de regulación de la proteína LOX2: 6 horas 1,40993; 24 horas 1,330034; 4 días 1,497468 y 8 días 1,593322. Estos resultados son diferentes a los encontrados en el presente trabajo y una cuantificación por qPCR lo determinaría así.

Se sabe que la biosíntesis del AJ se realiza a partir de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y se sintetiza por una de las siete ramas distintas que hay de la vía lipoxigenasa, la rama de la sintasa de óxido de aleno (AOS) (Feussner y Wasternack, 2002). Las otras seis ramas forman otras oxilipinas (productos de oxidación de los ácidos grasos insaturados) pero la rama AOS forma exclusivamente la oxilipina AJ a partir de 13-hidroperóxido (HPOT) originado desde el ácido linolénico (producto de la oxigenación de LOX2), lo que quiere decir que esta vía es interesantemente exclusiva, además se sabe claramente que la rama AOS compete con las otras ramas por el sustrato HPOT, lo que demuestra que la actividad de AOS es indispensable para un correcto control de la afluencia de HPOT en la biosíntesis de AJ (Andreou *et al.*, 2009). Además, se puede observar que los niveles de expresión de AOS en las dos variedades son semejantes a los de

LOX2, es lo que se espera teóricamente, al ser AOS la segunda molécula que interviene en la vía del ácido jasmonico. Esto determina aún más la activación de la vía. Por otro lado, se observa diferencias marcadas en el área registrada de los tiempos cero, esto podría indicar que AOS se expresa constitutivamente en el genotipo CMC 40 hasta que ocurre el ataque del ácaro y en ECU 72 la expresión es inducida por este.

Trabajos en mutantes deficientes de AOS de *Arabidopsis* atacadas por *Tetranychus urticae*, mostraron un aumento de 5 veces el daño en estas que en controles, además, larvas que se alimentaban de hojas control tardaban el doble en desarrollar protoninfas que en hojas mutantes (Bruinsma, 2014). En contraste, se encontró que la disrupción del gen AOS provocó que plantas de *Arabidopsis* fueran más resistentes al nematodo agallador *Meloidogyne javanica* (Naor *et al.*, 2018), lo que sugiere que la vía del ácido jasmonico frente a nematodos es presuntamente inhibida, pruebas en yuca podría confirmar/desmentir en parte esta teoría. Se sabe también que el ácido salicílico (AS) es antagonista de la vía del ácido jasmonico, que la activación de genes que codifican enzimas importante en la biosíntesis del mismo son reprimidas por AS (Leon *et al.*, 2010). Por tanto, los resultados obtenidos demuestran que AS no cumple ninguna función antagonista en la vía del ácido jasmonico de la

yuca cuando el ácaro la ataca, o posiblemente este antagonismo ocurre en la variedad CMC 40 y de manera paulatina.

Los factores de transcripción dependientes de la señal de AJ son de gran importancia para una correcta vía de señalización de AJ. MYC2 es el único factor de transcripción que interactúa con la proteína JAZ (represor transcripcional). Este factor de transcripción es el más importante porque activa la transcripción de genes de respuesta temprana que incluyen factores de transcripción como WRKY, MYB y AP2/ERF, genes de biosíntesis de AJ como LOX, AOS, OPR y proteínas JAZ. Lo que quiere decir que sin la acción de esta proteína no es posible la expresión de genes importantes involucrados en las respuestas de defensa frente a estreses bióticos y abióticos (Yan et al., 2013).

Esta interacción entre MYC2 y JAZ explica el ciclo de retroalimentación positiva en la biosíntesis de AJ. La formación de JA-IIE someterá al regulador negativo JAZ a la degradación proteasomal, lo que permite a MYC2 activar los promotores sensibles a JA de los genes de biosíntesis de JA. No obstante, los genes JAZ y MYC responden JA-IIE, permitiendo un reabastecimiento permanente de reguladores negativos (JAZ) y positivos (MYC2) que dan como resultado un ajuste de la expresión de

genes de biosíntesis de JA (Chung et al., 2008). Con base en lo expuesto anteriormente y comparado con los resultados obtenidos, podría sugerirse que en el genotipo ECU 72, al iniciar la infestación, la concentración de JA-IIE aumenta y por consiguiente la biosíntesis del AJ se produce, una vez superado el ataque al día 5-8, los niveles de JA-IIE se normalizan y la biosíntesis cesa. En el caso de CMC 40, los resultados son confusos, ya que aparentemente la concentración de JA-IIE inicial es alta pero disminuye a medida que el ataque persiste, y por lo tanto la vía no se activa, esto es coherente ya que la variedad susceptible, pero el alto nivel de expresión MYC2 en el tiempo cero muestra mecanismo molecular poco claro.

Por otro lado, un trabajo realizado por Ratlamwala en 2014, donde trabajaba con *Tetranychus urticae* y su ataque a tres diferentes genotipos de *A. thaliana*, demostró que los niveles de transcripción tanto del gen AOS como MYC2 no se redujeron significativamente ante el ataque del ácaro, lo que sugiere que este no afecta la capacidad de las plantas para montar una respuesta defensiva. Asimismo, recientemente Bruinsma (2014) encontró que en mutantes de *Arabidopsis myc2*, el daño era ~ 5 más severo, desarrollo de protoninfas más rápido y mortalidad muy baja, lo que indica que las defensas más efectivas contra ácaros necesita la expresión del gen MYC2.

La segunda mitad de la vía de la biosíntesis de ácido jasmónico (AJ) se realiza en el peroxisoma, e inicia con la conversión de OPDA, una ciclopentenona a ciclopentanona (3-oxo-2-(2'(Z)-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoic acid, OPC-8:0), catalizada por OPDA reductasa (OPR) (Yan et al., 2013). Además, en *Arabidopsis* y tomate estas familias se dividieron en dos grupos, el grupo II cataliza la conversión de OPDA a un precursor biosintético intermedio en la biosíntesis de JA, las familias pertenecientes al grupo I es poco probable que lo puedan hacer. Análisis químicos determinaron que OPR3 es responsable de la producción de AJ en tomate y *Arabidopsis* y que OPR1/OPR2 no (Breithaupt et al., 2009; Scalschi et al., 2015). También, en maíz la expresión de OPR2 aumenta en respuesta a heridas mecánicas el inductor de regurgitación de larvas de gusano cogollero (*Spodoptera exigua*) y al tratamiento con volátiles de hoja verde (Engelberth et al., 2007).

En los resultados encontrados se observa una disminución en el nivel de transcripción en la variedad ECU 72, rompiendo con el patrón de los genes LOX2, AOS y MYC2 (Tabla 5). Si una OPR se encarga de llevar a cabo la segunda parte de la biosíntesis del ácido jasmónico, se podría esperar, en teoría, que OPR2 mostrara una expresión similar a los genes ya mencionados, pero no es así, lo que sugiere que OPR2 no está involucrada

en la biosíntesis del ácido jasmónico. Con CMC 40 el comportamiento es difícil de explicar. Ahora bien, Marín (2015) encontró que la proteína OPR2 se induce desde las 6h hasta el día 8 en la variedad susceptible 60444, ante el ataque del ácaro verde (*M. tanajoa*). Estos datos son completamente diferentes a los obtenidos en el presente trabajo. Por consiguiente, dilucidar el mecanismo molecular alrededor de este gen ayudaría determinar su papel e importancia dentro de la vía del ácido jasmónico y/o defensa de la yuca, y una manera de hacerlo es por medio del silenciamiento de genes OPR, el gran aumento de OPDA sin el aumento proporcional de AJ revelará el OPR indicado.

Se ha demostrado que el gen CEV1 funciona en las etapas tempranas de las vías del ácido jasmónico y del etileno, como reguladores de estas. Además, este gen codifica una celulosa sintasa (CeSA3) asociado a la formación de la pared celular (Ellis y Turner, 2001). Ellis et al., (2002) caracterizaron el mutante *arabidopsis cev1* el cual tiene una expresión constitutiva de los genes de respuesta al estrés y mayor resistencia a patógenos fúngicos, y encontraron que la mutación estaba ubicada dentro de la región del gen de la celulosa sintasa (CeSA3), lo que quiere decir y evidencia que la inhibición de la síntesis de celulosa activa las respuestas de estrés dependientes de ácido jasmónico y etileno. Esto se

comprobó en el trabajo realizado por Ramires y colaboradores en el 2011, donde CeSA3 se reprimió luego de la infección de hongos en plantas de *Arabidopsis*. Nuestros resultados muestran niveles de expresión bajos del gen CEV1 en comparación a los otros genes evaluados (Tabla 5). Aun así el gen no se inhibe en ninguna de las dos variedades, lo que podría indicar que su función no está ligada a la defensa de la planta o no está asociada a las vías del AJ y ET.

Interacción entre Aleurotrachelus sociales y Manihot esculenta Crantz

Para el análisis molecular de la interacción entre la mosca blanca (*A. socialis*) y la yuca (*M. esculenta*) se manejaron 5 tiempos. Un tiempo inicial de 0 horas, seguido de 24 horas, 48 horas, 5 días y un tiempo final de 8 días. Al igual que en el sistema ácaro verde – yuca se trabajó con los mismo 5 genes evaluados en tal análisis.

El análisis semi cuantitativo de los resultados observados en los geles de agarosa (datos no mostrados), se realizó con ayuda del software ImageJ al realizar un análisis densitométrico de las bandas obtenidas. Los análisis se llevaron a cabo para cada variedad de manera independiente. Los resultados del análisis se muestran en la tabla 4.

El comportamiento de los genes LOX2 y AOS en la interacción mosca-yuca en las dos variedades es levemente distinto al observado en la interacción

ácaro-yuca. Con respecto a ECU 72, estos dos genes difieren en su expresión en el día 8. Encontrar un patrón similar entre LOX2 y AOS determina la activación de la vía del ácido jasmonico ante el ataque de la mosca, con la diferencia que la supresión ocurre entre el día 4-8. Por otro lado, CMC 40 muestra una expresión interesante. El gen LOX2 se comporta igual en las dos interacciones, aumentando el nivel de transcripción a medida que pasa el tiempo. No obstante, para el gen AOS la expresión es al contrario, disminuye. Con base en lo planteado anteriormente, se podría sugerir que en la interacción mosca-yuca, el genotipo resistente inicia la biosíntesis de AJ (LOX2) y cesa al día 4-8, pero la acción del gen AOS se mantiene fuertemente hasta el día 5; el genotipo CMC 40 aparentemente inicia la vía del ácido jasmonico fuertemente a lo largo de la infestación (LOX2) pero al no incrementar los niveles de transcripción del gen AOS, se sugiere que la vía no es completada (Tabla 4).

Ahora bien, el trabajo realizado por Zhang y colegas en 2013, demostraron que el ataque de mosca blanca sobre plantas de *Arabidopsis* activan genes relacionados con la síntesis del ácido jasmonico, como LOX2, pero inhibe aquellos genes receptivos a AJ que se encuentran aguas abajo, esto lo realiza específicamente el AS. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo y

Tabla 4. Resultados del análisis semi cuantitativo de la interacción mosca blanca – yuca.

Gen	Mosca	ECU 72			CMC 40		
	Tiempo	Área	Porcentaje %	D.R	Área	Porcentaje %	D.R
LOX2	0h	15993,489	14,1	1,00	14450,882	13,5	1,00
	24h	25919,924	22,9	1,62	19416,853	18,1	1,34
	48h	27037,388	23,9	1,69	22454,510	20,9	1,55
	5d	23368,731	20,7	1,46	24275,631	22,6	1,68
	8d	20722,246	18,3	1,30	26798,731	25,0	1,85
AOS	0h	3788,447	4,1	1,00	28364,317	26,2	1,00
	24h	23333,731	25,1	6,16	29269,782	27,1	1,03
	48h	22062,853	23,7	5,82	23085,267	21,3	0,81
	5d	29487,681	31,7	7,78	21878,024	20,2	0,77
	8d	14423,660	15,5	3,81	5540,569	5,1	0,20
MYC2	0h	19208,953	18,0	1,00	26352,974	34,7	1,00
	24h	29935,338	28,1	1,56	17839,095	23,5	0,68
	48h	29749,338	27,9	1,55	13275,803	17,5	0,50
	5d	25200,459	23,7	1,31	18221,581	24,0	0,69
	8d	2362,690	2,2	0,12	273,234	0,4	0,00
OPR2	0h	28988,903	27,5	1,00	14936,296	18,8	1,00
	24h	26738,196	25,4	0,92	16719,388	21,0	1,12
	48h	25899,146	24,6	0,89	20417,095	25,7	1,37
	5d	22634,267	21,5	0,78	26676,530	33,6	1,79
	8d	1128,062	1,1	0,04	697,598	0,9	0,00
CEV1	0h	1204,062	12,8	1,00	4733,912	67,6	1,00
	24h	1416,941	15,1	1,18	1127,426	16,1	0,24
	48h	2178,962	23,2	1,81	376,870	5,4	0,08
	5d	4577,912	48,8	3,80	761,163	10,9	0,16
	8d	0	0,0	0,00	0	0,0	0,00
G3PDH	0h	18572,418	19,6	1,00	9436,882	12,9	1,00
	24h	25902,146	27,3	1,39	14980,731	20,5	1,59
	48h	25313,731	26,7	1,36	19276,731	26,4	2,04
	5d	23275,803	24,6	1,25	24978,803	34,2	2,65
	8d	1670,426	1,8	0,09	4424,276	6,1	0,47
UBQ10	0h	3715,731	3,8	1,00	7045,974	16,2	1,00
	24h	8360,288	8,6	2,25	12803,418	29,4	1,82
	48h	10310,752	10,6	2,78	10130,459	23,2	1,44
	5d	66736,014	68,9	17,96	7330,61	16,8	1,04
	8d	7785,874	8,0	2,10	6264,803	14,4	0,89

podría explicar los bajos niveles de transcripción del gen CEV1, al posiblemente encontrarse aguas abajo. Otro estudio realizado por Zhang y colaboradores en el mismo año, determinaron que los niveles de LOX2 disminuyeron 1 y 3 días después de la infestación con *Bemisia tabaci*, y en tratamientos exógenos con AS, los niveles aumentaron a las 2h y 6h de la aplicación, pero aumentó después de 24h. Concluyendo que la activación del AS, suprime las defensas directas basadas en JA. Además, un estudio realizado en tomate, encontró que la saliva de la mosca blanca *B. tabaci*, provocó que los niveles de expresión de LOX y AOS fueran significativamente menores que en plantas control (Su *et al.*, 2015). Lo anterior sugiere que el genotipo ECU 72 es resistente hasta los días 5-8.

Como se mencionó anteriormente, MYC2 es un factor de transcripción que activa la expresión de genes relacionados con la respuesta temprana de defensa y la vía del ácido jasmónico. Los resultados encontrados en la interacción mosca-yuca revelan que en ECU 72 el gen MYC2 se expresa fuertemente hasta el día 8, cuando posiblemente el ataque se ha superado, estos datos concuerdan con los obtenidos en los genes LOX2 y AOS, ya que al disminuir la presencia de MYC2, la expresión de estos es inhibida. Con respecto a CMC 40, sucede algo parecido, al día 8 la expresión cesa

considerablemente al igual que el gen AOS, pero no en LOX2, esto confirma de cierta forma la teoría mencionada anteriormente, la sobreexpresión de LOX2 activa la biosíntesis del AJ pero no se completa debido la supresión paulatina del gen AOS, ratificando su condición de variedad susceptible.

Li y colegas en el 2014, encontraron que β C1 del virus de la viruta amarilla de la hoja del tomate, un begomovirus monopartito, es un factor genético viral que suprime la biosíntesis del terpeno vegetal. β C1 interactúa con el factor de transcripción MYC2 de modo que la activación de genes asociados a terpenos se vea comprometida y por consiguiente la resistencia a la mosca blanca se reduzca considerablemente. Esto podría explicar los niveles de transcripción tan bajos encontrados en las dos variedades a los 8 días de interacción. Esta relación entre el patógeno y la mosca blanca se conoce como mutualismo indirecto, ya que el patógeno puede provocar que la yuca infectada promueva el rendimiento de la mosca, lo que ayuda a la propagación del vector. Asimismo, esta relación entre β C1 y MYC2 sugeriría que la expresión de genes como LOX2 y AOS cesa, pero no es así, lo que implica que el patógeno promueve el rendimiento de la mosca no a través de una represión directa de la vía de síntesis de JA.

En la expresión del gen OPR2 se encontró que el genotipo resistente presenta una mayor expresión que el

genotipo susceptible y que en ambos genotipos al 8 día la expresión cesa significativamente. Como se ha mencionado anteriormente los OPR se encargan de catalizar OPDA, en la segunda parte de la biosíntesis de AJ, según los resultados obtenidos OPR2, en la variedad resistente, muestra niveles de transcripción similares a los de esta misma variedad pero en la interacción ácaro-yuca, lo que sugiere que la función es la misma ante el ataque de los dos artrópodos plaga. Dilucidar la función de este gen permitirá comprender su importancia en la vía del ácido jasmonico.

Los resultados obtenidos de la expresión de CEV1 en las dos variedades, muestran los niveles de transcripción más bajos obtenidos de todos los genes en los 5 tiempos evaluados, esto podría indicar que tal gen es relativamente reprimido por la alimentación de *A. socialis*.

El gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) usado como gen de referencia mostró una expresión poco estable tanto en las dos variedades de yuca como en el ataque de los dos artrópodos plaga. Lo que sugiere que este gen utilizado normalmente como gen de referencia, no cumple su objetivo en las condiciones experimentales del presente trabajo. El trabajo realizado por Expósito-Rodríguez et al., (2008) en el desarrollo del tomate determinó que precisamente el gen G3PDH mostraba patrones de expresión

inestables y por lo tanto era el control interno menos fiable. UBQ10 mostró en la interacción ácaro verde-yuca, una expresión un poco más estable que G3PDH, lo que podría sugerir el uso como control interno en una futura investigación con genes relacionados a la vía del ácido jasmonico o incluso genes asociados con la defensa de la planta frente a este artrópodo plaga. Moreno *et al.*, (2011) establecieron que UBQ10 presenta un patrón de expresión muy estable en diferentes tejidos infectados con cassava brown streak virus (CBSV) y variedades de yuca. El cambio de Taq polimerasa pudo influir en los resultados obtenidos.

Conclusiones

Se estableció la preferencia del ácaro verde de ovipositar sobre el genotipo CMC 40 y no sobre ECU-72, lo que confirma las respectivas características de susceptible y resistente.

Cuatro de los genes evaluados (AOS, MYC2, LOX y OPR2) mostraron una regulación positiva tanto en el ataque del ácaro como en el de la mosca, CEV1 no se expresó notoriamente durante la interacción mosca-yuca.

G3PDH no presenta una expresión estable durante el ataque del ácaro y la mosca sobre la yuca y por consiguiente se recomienda no usarlo como control interno. El gen UBQ10 mostró una expresión estable en la interacción ácaro-yuca y por lo tanto

se recomienda como control interno en una futura investigación con genes relacionados a la vía del ácido jasmónico o incluso genes asociados con la defensa de la planta frente a este artrópodo plaga.

Se observa una correlación en la interacción ácaro-yuca de los genes LOX2, AOS y MYC2, demostrando parcialmente la activación de la vía del ácido jasmónico en la yuca.

Se logró comprender parcialmente los mecanismos subyacentes de las respuestas de la yuca a dos plagas lo cual permitirá desarrollar estrategias de protección de cultivos en un contexto de múltiples atacantes.

Los resultados obtenidos de la expresión diferencial de genes relacionados con la vía del ácido jasmónico podrían proporcionar recursos muy valiosos en programas de mejoramiento molecular de yucas resistentes a enfermedades y artrópodos plaga.

Agradecimientos Al apoyo financiero de la convocatoria interna de la Universidad de los Llanos del año 2015 para apoyar económicamente a ejecución de proyectos de investigación

Referencias

Álvarez E, Bellotti AC, Calvert L, Arias B, Cadavid LF, Pineda B, Llano G, Cuervo M. 2002. Guía Práctica para el manejo de las enfermedades, las plagas y las deficiencias nutricionales de la Yuca. CLAYUCA-CIAT.

Andreou A, Brodhun F, and Feussner I (2009) Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog Lipid Res* 48:148-170.

Bari R, Jones J: Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 2009, 69:473-488.

Bellotti AC, Smith L, Lapointe SL. 1999. Recent advances in cassava pest management. *Annual review of entomology*, 44, 343-370.

Bellotti AC. 2002. Insectos y Ácaros de la yuca y su control. En: *El Cultivo De La Yuca En El Tercer Milenio. Sistemas Modernos De Producción, Procesamiento, Utilización Y Comercialización*. Cali: CIAT

Bellotti, A. C., Melo Molina, E. L., Arias, V. B., Herrera Fernández, C. J., Hernández, M., Holguín, A., ... & Trujillo García, H. E. (2005). Biological control in the neotropics: a selective review with emphasis on cassava.

Bellotti, A., Campo, B. V. H., & Hyman, G. (2012). Cassava production and pest management: present and potential threats in a changing environment. *Tropical Plant Biology*, 5(1), 39-72.

Bellotti, A.C. 2008. Cassava pests and their management. J.L. Capinera (Ed.). *Encyclopedia of Entomology*. 2nd Ed. Springer. Dordrecht, the Netherlands.

Breithaupt C, Kurzbauer R, Schaller F, Stintzi A, Schaller A, Huber R, Macheroux P, and Clausen T (2009) Structural basis of substrate specificity of plant 12-oxophytodienoate reductases. *J Mol Biol* 392:1266-1277

Bruinsma, K. A. (2014). Arabidopsis thaliana-Spider Mite Interaction: Plant Perception, Signalling, and Response.

Ceballos, H., Fregene, M., Lentini, Z., Puentes, J., Perez, J., Rosero, A.,

- Tofiño, A. 2006. Development and identification of high-value cassava clones. *Acta Horticola* 703: 63-70.
- Chung HS, Koo AJ, Gao X, Jayanty S, Thines B, Jones AD, and Howe GA (2008) Regulation and function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol* 146:952-964.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C., Turner, J.G. The Arabidopsis mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell*. 2002, 14, 1557-1566.
- Exposito-Rodriguez, M., Borges, A. A., Borges-Perez, A., and Perez, J. A. (2008). Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol*. 8:131. doi: 10.1186/1471-2229-8-131.
- Feussner I, and Wasternack C (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* 53:275-297.
- Hasibuan S and Nazir N. 2017. The development strategy of sustainable bioethanol industry on iconic Sumba island, Eastern Indonesia. *Int J Adv Sci Eng Inf Technol* 7: 276-283.
- Herren HR, Neuenschwander P. 1991 Biological control of cassava pests in Africa. *Annual Review of Entomology* 36, 257-283.
- Jansson, C., Westerbergh, A., Zhang, J., Hu, X., Sun, C. 2009. Cassava, a potential biofuel crop in (the) People's Republic of China. *Applied Energy* 86, Supplement 1: S95-S99
- Li, R., Weldegergis, B. T., Li, J., Jung, C., Qu, J., Sun, Y., ... & Chua, N. H. (2014). Virulence factors of geminivirus interact with MYC2 to subvert plant resistance and promote vector performance. *The Plant Cell*, tpc-114.
- Marín Colorado JA. 2015. Caracterización Molecular de la Resistencia en Yuca (*Manihot esculenta* Crantz) al ataque del ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*): una aproximación proteómica. Tesis de doctorado. Universidad del Valle - Univalle.
- Maserti, B. E., Del Carratore, R., Della Croce, C. M., Podda, A., Migheli, Q., Froelicher, Y. & Rossignol, M. (2011). Comparative analysis of proteome changes induced by the two spotted spider mite *Tetranychus urticae* and methyl jasmonate in citrus leaves. *Journal of plant physiology*, 168(4), 392-402.
- Mesa, N., Bellotti, A., Duque, M. 1987. Tablas de vida de *Mononychellus progresivus* Doreste y *Tetranychus urticae* (Koch) (Acarina: Tetranychidae) en yuca. *Revista Colombiana de Entomología* 13 (2): 11-22.
- Mochizuki, S., Sugimoto, K., Koeduka, T., & Matsui, K. (2016). Arabidopsis lipoxygenase 2 is essential for formation of green leaf volatiles and five-carbon volatiles. *FEBS letters*, 590(7), 1017-1027.
- Moreno I, Grussem W, Vanderschuren H. 2011. Reference genes for reliable potyvirus quantitation in cassava and analysis of Cassava brown streak virus load in host varieties. *Journal of virological methods*, 177(1), 49-54.
- Nhassico, D., Muquingue, H., Cliff, J., Cumbana, A., Bradbury, J.H. 2008. Rising African cassava production, diseases due to high cyanide intake and control measures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 2043-2049.

- Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SC: Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 2009, 5:308-316.
- Ramírez N, Jiménez, LM, Ramírez PA, Jiménez PA. 2010. El cultivo de la yuca *Manihot* esculenta Crantz; para producción forrajera y su utilización en la alimentación de bovinos: manual técnico (No. Doc. 23045) CO-BAC, Bogotá).
- Ratlamwala, H. (2014). Two spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) selection to *Arabidopsis thaliana*.
- Scalschi, L., Sanmartín, M., Camañes, G., Troncho, P., Sánchez-Serrano, J. J., García-Agustín, P., & Vicedo, B. (2015). Silencing of OPR3 in tomato reveals the role of OPDA in callose deposition during the activation of defense responses against *Botrytis cinerea*. *The Plant Journal*, 81(2), 304-315.
- Stupak, M., Vanderschuren, H., Gruissem, W., Zhang, P. 2006. Biotechnological approaches to cassava protein improvement. *Trends in Food Science & Technology*. 17(12): 634-641.
- Su, Q., Oliver, K. M., Xie, W., Wu, Q., Wang, S., & Zhang, Y. (2015). The whitefly-associated facultative symbiont *Hamiltonella defensa* suppresses induced plant defences in tomato. *Functional Ecology*, 29(8), 1007-1018.
- Toyoda, K., Kawanishi, Y., Kawamoto, Y., Kurihara, C., Yamagishi, N., Tamura, A. & Shiraishi, T. (2013). Suppression of mRNAs for lipoxygenase (LOX), allene oxide synthase (AOS), allene oxide cyclase (AOC) and 12-oxo-phytodienoic acid reductase (OPR) in pea reduces sensitivity to the phytotoxin coronatine and disease development by *Mycosphaerella pinodes*. *Journal of general plant pathology*, 79(5), 321-334.
- Trujillo, H. E., Arias, B., Guerrero, J. M., Hernández, P., Bellotti, A. C., and Peña, J. E. 2004. Survey of parasitoids of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) in cassava growing regions of Colombia and Ecuador. *Florida Entomologist* 87, 268-273.
- Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of botany*, 111(6), 1021-1058.
- Yan, Y., Borrego, E., & Kolomiets, M. V. (2013). Jasmonate biosynthesis, perception and function in plant development and stress responses. In *Lipid metabolism*. InTech.
- Zhang, P. J., Li, W. D., Huang, F., Zhang, J. M., Xu, F. C., & Lu, Y. B. (2013). Feeding by whiteflies suppresses downstream jasmonic acid signaling by eliciting salicylic acid signaling. *Journal of chemical ecology*, 39(5), 612-619.